



Facultad de Ciencias
Campus de Puerto Real

***Estudio de la proliferación de células sobre
polímeros impregnados mediante tecnología
supercrítica con extractos naturales***

**Trabajo Final de Grado
Grado en Biotecnología
Curso 2019 - 2020**

**Departamentos de Ingeniería Química y Tecnología de Alimentos
Y
Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública**

Autor:

Jorge Cabañas Penagos

Tutores:

Casimiro Mantell Serrano

María del Carmen Durán Ruiz

AGRADECIMIENTOS

“You must trust in others or
success is impossible”

Nunca pensé que llegaría el momento de escribir estas líneas. Aún recuerdo el día en el que entré en clase por primera vez durante aquella semana de bienvenida, un día que supuso el punto de partida de una etapa que esperaba con ilusión y que sin duda recordaré con mucho cariño. Han sido 4 años que al principio parecían interminables pero que se han ido en un abrir y cerrar de ojos gracias a esas personas que me han acompañado a lo largo de este camino, tanto en los buenos como en los malos momentos.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis tutores Casimiro y Carmen por confiar en mí y darme la oportunidad de realizar este TFG con ellos. También me gustaría agradecerles a Teresa e Ismael su paciencia y el apoyo que me han ofrecido durante las incontables horas que hemos pasado juntos en el laboratorio. Tampoco quiero olvidarme de Cristina y de Lourdes por estar siempre dispuestas a ayudar en lo que hiciese falta. Gracias a todos de corazón, especialmente por apoyarme cuando decidí seguir con la bata puesta en estos tiempos de pandemia.

Cómo no también quiero dar las gracias a todos mis compañeros de laboratorio, pero sobre todo a Pepi, Paula y Jose por haber aguantado mis manías a la hora de trabajar, por esos ratitos de charla mientras esperábamos los resultados y por alegrarme siempre los días con cualquier cosa que se les pasase por la cabeza.

Gracias también a mis compañeros de clase, muchos de ellos ya amigos, por haberme dado la oportunidad de conocer a personas maravillosas. Estoy seguro de que estos años no hubiesen sido lo mismo sin vosotros.

Y como lo mejor se hace esperar, he querido reservar este último párrafo para mi familia. Gracias a todos de corazón por estar a mi lado desde que tengo uso de razón, por apoyarme en todo momento de manera incondicional, por hacerme creer en mí y por enseñarme a no rendirme nunca. Espero que estés orgulloso de mí allá donde estés abuelo. Os quiero a todos.

ÍNDICE

1. LISTA DE ABREVIATURAS	1
2. PROPUESTAS DEL TFG ASIGNADO.....	2
3. RESUMEN	3
4. ABSTRACT	4
5. INTRODUCCIÓN.....	5
5.1. Desarrollo de stents poliméricos	5
5.1.1. Polímeros biodegradables en el ámbito biomédico	6
5.1.2. Armazones bioabsorbibles y agentes terapéuticos empleados	7
5.2. Compuestos naturales	7
5.2.1. Compuestos bioactivos en las hojas de olivo	8
5.2.2. Compuestos bioactivos en el hollejo de uva tinta.....	9
5.2.3. Compuestos bioactivos en las hojas de mango.....	9
5.3. Técnicas de extracción a alta presión	10
5.3.1. Extracción con líquidos presurizados (PLE)	10
5.4. Métodos de fijación del agente terapéutico	11
5.4.1. Impregnación con fluidos supercríticos.....	12
6. OBJETIVOS	13
7. SOLUCIÓN TÉCNICA	14
7.1. Materiales y métodos.....	14
7.1.1. Materias primas	14
7.1.2. Reactivos y materiales	15
7.1.3. Equipos.....	16
7.1.4. Metodología de extracción con líquidos presurizados.....	18
7.1.5. Caracterización de los extractos obtenidos.....	19
7.1.5.1. Rendimiento de la extracción	19
7.1.5.2. Determinación del contenido total de polifenoles (TPC)	19

7.1.5.3. Determinación del contenido total de antocianos	21
7.1.5.4. Determinación de la actividad antioxidante.....	22
7.1.6. Metodología de impregnación con fluidos supercríticos.....	25
7.1.7. Caracterización de los polímeros impregnados	26
7.1.7.1. Estudios de microscopía electrónica de barrido	26
7.1.7.2. Determinación de la cantidad de extracto impregnada	26
7.1.7.3. Determinación de la actividad antioxidante	27
7.1.8. Ensayos de viabilidad	28
7.1.8.1. Análisis del efecto de los extractos puros	28
7.1.8.2. Análisis de la proliferación sobre el polímero impregnado	29
7.1.9. Análisis estadístico de los resultados.....	29
7.2. Resultados y discusión	30
7.2.1. Extracción con líquidos presurizados	30
7.2.1.1. Rendimiento del proceso extractivo	30
7.2.1.2. Contenido total de polifenoles	31
7.2.1.3. Contenido total de antocianos	33
7.2.1.4. Actividad antioxidante	33
7.2.2. Impregnación con fluidos supercríticos.....	35
7.2.2.1. Análisis de la matriz polimérica mediante microscopía electrónica	35
7.2.2.2. Rendimiento del proceso de impregnación	36
7.2.2.3. Actividad antioxidante del polímero impregnado	37
7.2.3. Ensayos de viabilidad	38
7.2.3.1. Efecto de los extractos puros en el proceso de endotelización	38
7.2.3.2. Efecto del PLA impregnado en el proceso de endotelización	40
8. CONCLUSIONES.....	42
9. PERSPECTIVAS DE FUTURO	43
10. BIBLIOGRAFÍA.....	45

1. LISTA DE ABREVIATURAS

AAI: Índice de actividad antioxidante (*Antioxidant activity index*)

AB: Armazón bioabsorbible

AGEq: Equivalentes de ácido gálico

AM: Antocianina monomérica

API: Agente terapéutico (*Active Pharmacological Ingredient*)

BPR: Válvula reguladora de presión (*Back Pressure Regulator*)

CAD: Enfermedad arterial coronaria (*Coronary Artery Disease*)

CO₂: Dióxido de carbono

CO₂SC: Dióxido de carbono supercrítico

CSIC: Consejo Superior de Investigaciones Científicas

DPBS: Tampón fosfato salino de Dulbecco (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*)

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

EBM@-2: Medio basal de células endoteliales-2 (*Endothelial Cell Basal Medium-2*)

EC₅₀: Concentración efectiva

ECFCs: Células endoteliales formadoras de colonias (*Endothelial colony forming cells*)

ESE: Extracción con solvente mejorada (*Enhanced Solvent Extraction*)

EtOH: Etanol

FBS: Suero fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*)

GBT: Grado en Biotecnología

hEGF: Factor de crecimiento epidérmico humano (*Human Epidermal Growth Factor*)

hFGF: Factor de crecimiento fibroblástico humano (*Human Fibroblast Growth Factor*)

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia (*High performance liquid chromatography*)

ICP: Intervención coronaria percutánea

IHSM: Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea 'La Mayora'

Mv-3-glc: Malvidina-3-glucósido

Na₂CO₃: Carbonato de sodio

NGC: Conducto nervioso guía (*Nerve guide conduit*)

PCL: Policaprolactona

PCLA: Copolímero de caprolactona y ácido láctico

PET: Tereftalato de polietileno

PGA: Ácido poliglicólico

PLA: Ácido poliláctico

PLE: Extracción con líquidos presurizados (*Pressurized Liquid Extraction*)

PP: Polipropileno

R3-IGF-1: Análogo del factor de crecimiento insulínico humano tipo 1 (*Human Insuline-like Growth Factor 1*)

RIS: Reestenosis intra-stent

SC-ICYT: Servicios Centrales de Investigación Científica y Tecnológica

SEM: Microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscopy*)

SFA: Stent farmacoactivo

SFE: Extracción con fluidos supercríticos (*Subcritical Fluid Extraction*)

SM: Stent metálico

SWE: Extracción con agua subcrítica (*Subcritical Water Extraction*)

TAC: Contenido total de antocianos

TPC: Contenido total de polifenoles

V_{desp}: Velocidad de despresurización

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

2. PROPUESTA DEL TFG ASIGNADO

- **Titulación** → Grado en Biotecnología (GBT).
- **Título** → Estudio de la proliferación de células sobre polímeros impregnados mediante tecnología supercrítica con extractos naturales.
- **Curso** → 2019/2020.
- **Tutor 1** → casimiro.mantell@uca.es (INGENIERÍA QUÍMICA Y TECN. DE ALIMENTOS).
- **Tutor 2** → maricarmen.duran@gm.uca.es (BIOMEDICINA, BIOTECNOLOGÍA Y SALUD PÚBLICA).
- **Carácter** → Iniciación a la investigación.
- **Descripción** → La aplicación de la impregnación supercrítica para adicionar un fármaco o sustancia activa en endoprótesis poliméricas tiene unas importantes ventajas sobre los procesos convencionales. El proceso de impregnación utilizando fluidos supercríticos disminuye la utilización de disolventes tóxicos y trabaja a temperaturas moderadas. No obstante, es importante garantizar que el producto impregnado mantenga las propiedades biomédicas necesarias para facilitar la compatibilidad de la endoprótesis con el organismo receptor. La función del fármaco debe ser la de generar la endotelización de forma controlada en el entorno de la prótesis, evitando la contaminación microbiana y la inflamación del tejido circundante. Una de las técnicas que permite analizar el crecimiento de estas células de forma controlada es la medida de la proliferación celular en contacto con el polímero impregnado, mediante marcajes específicos.

La presente propuesta de TFG se centra en analizar la impregnación supercrítica de extractos naturales en polímeros que puedan ser utilizados en la generación de endoprótesis, y posteriormente determinar la capacidad de estos polímeros para generar una endotelización controlada. Se analizarán diversas condiciones de impregnación y se ensayará fundamentalmente la impregnación de polifenoles obtenidos a partir de residuos de la industria agroalimentaria. Los ensayos preliminares determinarán el extracto a analizar. El polímero a impregnar será fundamentalmente PLA o PCLA, dado que está teniendo recientemente un impacto importante a nivel científico por su posibilidad de ser utilizado en stents cardíacos. No obstante, se deja abierta la opción a utilizar otros polímeros aptos para su utilización como prótesis. Una vez se disponga del polímero impregnado, se realizarán los ensayos de endotelización, seleccionando las condiciones de impregnación que generen un producto que facilite la generación del tejido de manera controlada.

3. RESUMEN

El desarrollo de materiales poliméricos para aplicaciones biomédicas ha experimentado un avance significativo. Dado su carácter biodegradable, su biocompatibilidad y su producción económica y reproducible, los poliésteres sintéticos como el ácido poliláctico (PLA) se han visto favorecidos en el desarrollo de dispositivos terapéuticos como endoprótesis, “scaffolds” tridimensionales para la ingeniería de tejidos o stents destinados al tratamiento de la enfermedad arterial coronaria (CAD). La incorporación de diversos agentes terapéuticos (API) a este tipo de dispositivos, los convierte en sistemas liberadores de fármacos a nivel local, siendo capaces de minimizar las complicaciones asociadas al proceso quirúrgico como pueden ser el malestar postoperatorio, episodios de contaminación microbiana o inflamación e incluso mejorando el efecto del implante sobre los tejidos circundantes llegando a posibilitar su regeneración.

En este Trabajo de Fin de Grado se pretende estudiar la extracción de compuestos bioactivos a partir de residuos agroalimentarios como son las hojas de mango, las hojas de olivo y el hollejo de uva tinta; su posterior impregnación asistida por CO₂ supercrítico (CO₂SC) en uno de los polímeros más utilizados en el diseño de endoprótesis como es el PLA y el efecto que estas matrices impregnadas con extractos naturales tienen sobre el proceso de proliferación celular.

Los extractos naturales se obtienen mediante la técnica de extracción con líquidos presurizados (PLE) a unas condiciones de 80°C y 200 bar, empleando agua y etanol como disolventes. Los extractos obtenidos se caracterizan en términos de contenido total de polifenoles (TPC), capacidad antioxidante y en el caso de los extractos de hollejo, también en términos de contenido total de antocianos (TAC). Tras los correspondientes análisis, los extractos etanólicos, especialmente el de mango, resultan aquellos con un mayor poder antioxidante.

Las matrices de PLA se impregnan con los extractos etanólicos mediante CO₂SC manteniendo constantes la presión (250 bar) y la temperatura (55°C) de trabajo. Los productos resultantes se estudian y se determina que su carga de impregnación oscila entre el 1-2%. El polímero impregnado, es además capaz de mantener las propiedades antioxidantes demostrando la posibilidad de desarrollar productos con aplicaciones biomédicas mediante esta tecnología.

Mediante ensayos *in vitro* con células endoteliales formadora de colonias (ECFC_s) se analiza el efecto de los distintos extractos puros y del PLA impregnado sobre el proceso de proliferación celular. Concentraciones elevadas de extractos, como norma general, se traducen en descenso de la proliferación y de la viabilidad celular, aunque se han observado indicios de efectos proangiogénicos. Por su parte, el carácter preliminar de los ensayos con PLA hace necesario repetir los mismos en condiciones óptimas ya que los resultados no han sido concluyentes.

4. ABSTRACT

The development of polymeric materials for biomedical applications has undergone significant advancement. Given their biodegradable nature, their biocompatibility and their economic and reproducible production, synthetic polyesters such as polylactic acid have been favored in the development of therapeutic devices such as endoprostheses, three-dimensional scaffolds for tissue engineering or stents for the treatment of coronary artery disease. The incorporation of various therapeutic agents to this type of device turns them into drug-releasing systems at the local level, minimizing complications associated with the surgical process such as postoperative discomfort, episodes of microbial contamination or inflammation locally and even improving the effect of the implant on the surrounding tissues, enabling their regeneration.

This Final Degree Project aims to study the extraction of bioactive compounds from agro-food waste such as mango leaves, olive leaves and red grape skins; its subsequent impregnation assisted by supercritical CO₂ in one of the most used polymers in the design of endoprosthesis, such as PLA and the effect that these impregnated matrices with natural extracts have on the cell proliferation process.

Natural extracts are obtained by the pressurized liquid extraction technique at conditions of 80°C and 200 bar, using water and ethanol as solvents. The extracts obtained are characterized in terms of total polyphenol content, antioxidant capacity and, in the case of the red grape skin extracts, also in terms of total anthocyanin content. After the corresponding analysis, the ethanolic extracts, especially that of mango, are those with a greater antioxidant power.

The PLA matrices are impregnated with the ethanolic extracts by means of supercritical CO₂, keeping constant the pressure (250 bar) and the working temperature (55°C). The resulting products are studied and it is determined that their impregnation load ranges between 1-2%. The impregnated polymer is also capable of maintaining antioxidant properties, demonstrating the possibility to develop products with biomedical applications using this technology.

Through in vitro assays with endothelial colony forming cells, the effect of the different pure extracts and the impregnated PLA on the cell proliferation process is analyzed. High concentrations of extracts generally result in decreased proliferation and cell viability, although indications of proangiogenic effects have been observed. On the other hand, the preliminary nature of the tests with PLA makes it necessary to repeat them under optimal conditions since the results have not been conclusive.

5. INTRODUCCIÓN

5.1. DESARROLLO DE STENTS POLIMÉRICOS

El uso de endoprótesis, stents y “scaffolds” para el tratamiento de enfermedades o para el tratamiento quirúrgico de diferentes dolencias ha sufrido en las últimas décadas una evolución tecnológica notable. El uso de nuevos materiales, la adición de fármacos a estos dispositivos, y la aplicación de técnicas de fabricación aditiva en la generación de estos productos está siendo objeto de discusión de la comunidad científica internacional en los últimos años. Las posibilidades que ofrecen este tipo de dispositivos son innumerables y van desde el diseño de armazones tridimensionales para la regeneración de tejido óseo y cartilaginoso (Y. Zhang et al., 2019), la fabricación de anclajes de sutura para la fijación de tendones y ligamentos al hueso (Chaudhry, Dehne, & Hussain, 2019) o la producción de conductos nerviosos guías (NGC) para promover la regeneración de nervios periféricos (X. Zhang et al., 2020) hasta el desarrollo de stents urinarios destinados a preservar el drenaje urinario cuando la permeabilidad ureteral se deteriore o exista un riesgo considerable de oclusión (al-Aown et al., 2010)

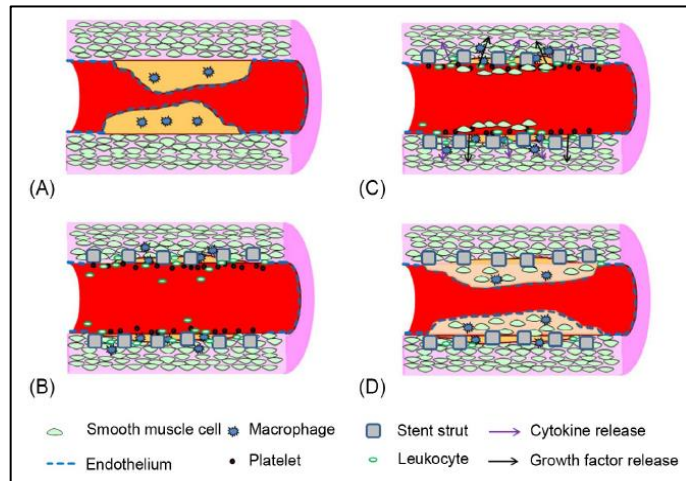
Dentro del grupo de stents nos encontramos con stents poliméricos farmacoactivos y biodegradables cuya aplicación fundamental para el tratamiento de la enfermedad arterial coronaria (CAD) o cardiopatía coronaria ha propiciado en gran medida el desarrollo de este tipo de dispositivos durante las últimas décadas. La CAD sigue siendo la principal causa de muerte a nivel mundial, como resultado de la formación de una placa aterosclerótica en la pared arterial que reduce de manera progresiva la cavidad disponible para el flujo sanguíneo, incrementando así el riesgo de isquemia en el tejido circundante y la probabilidad de que tenga lugar un infarto de miocardio (McCormick, 2018).

Durante las últimas décadas, la intervención coronaria percutánea (ICP) se ha convertido en un tratamiento de referencia a la hora de conseguir una revascularización de los vasos afectados. Por medio de un catéter, a través de una arteria periférica, se introduce un balón que se infla abriendo y restaurando el flujo sanguíneo en el vaso afectado. El implante de un dispositivo de soporte mecánico, también conocido como stent, consigue disminuir el retroceso elástico y la reestenosis asociada a la ICP (Iqbal, Gunn, & Serruys, 2013; Tomberli, Mattesini, Baldereschi, & Di Mario, 2018).

No obstante, a pesar de los prometedores resultados iniciales, el uso de stents en las ICP ha derivado en dos grandes complicaciones asociadas, como son la trombosis derivada de un retraso en la endotelización y la reestenosis intra-stent (RIS) (Htay & Liu, 2005). La RIS es una respuesta fisiopatológica provocada por la expansión arterial y la implantación del stent. Consiste en una cascada de eventos, mediados por neutrófilos, macrófagos y monocitos que se traduce en la formación de una neointima a partir de células musculares lisas y componentes de la matriz extracelular (ver figura 1).

Como resultado se produce una reducción de la sección del lumen del vaso sanguíneo (Elmore, Mehanna, Parikh, & Zidar, 2016; Mitra & Agrawal, 2006).

Figura 1. Vista esquemática de RIS. (A) Arteria coronaria con estrechamiento del lumen por una placa aterosclerótica. (B) El stent implantado causa daños en la pared del vaso, resultando en una adhesión/activación plaquetaria con reclutamiento de neutrófilos, monocitos y macrófagos. (C) Liberación de citoquinas y factores de crecimiento estimula el crecimiento de células musculares lisas. (D) Neoíntima madura formada, constituida por célula musculares lisas y matriz extracelular, recubierta por nuevo endotelio (McCormick, 2018).



Para poder solventar estos problemas, los stents han sufrido numerosas transformaciones, pasando de los clásicos stents metálicos (SM) a stents farmacoactivos (SFA), con una estructura más compleja que incluye una cubierta polimérica que contiene un fármaco anti-proliferativo que es liberado localmente. En lo que respecta a la cubierta del soporte metálico, el uso de polímeros biodegradables y con mayor biocompatibilidad ha permitido subsanar algunos de los inconvenientes clínicos que se producen a largo plazo en caso de recurrir a polímeros más duraderos (Stefanini et al., 2012). Una última variante, destinada a poner fin a los eventos adversos tardíos derivados del uso de los SFA mencionados anteriormente son los denominados armazones bioabsorbibles (AB). Constituyen un sostén mecánico transitorio en el vaso sanguíneo, cuya plataforma completa se degrada y se reabsorbe una vez conseguido el efecto deseado, eliminando así el riesgo asociado a la presencia de un armazón metálico y garantizando el correcto estado del vaso afectado (Ang et al., 2018; Tomberli et al., 2018).

5.1.1. LOS POLÍMEROS BIODEGRADABLES EN EL ÁMBITO BIOMÉDICO

La medicina regenerativa ha supuesto un importante avance en el tratamiento médico, basado en los principios de la tecnología de células madre y la ingeniería de tejidos para reemplazar o regenerar tejidos y órganos humanos y restaurar sus funciones. Una de las aproximaciones para conseguir esto es el uso de materiales biológicos o sintéticos en el desarrollo de implantes quirúrgicos y complejos armazones biocompatibles que permitan el desarrollo de procesos de reparación y crecimiento celular (Sampogna, Guraya, & Forgione, 2015).

Actualmente, las cirugías de implantación regenerativa, el cultivo de células terapéuticas y la reparación de tejidos representan un mercado con un valor aproximado de 23.000 millones de dólares, con un incremento hasta los 94.200 millones previsto para finales de 2025. Los poliésteres sintéticos biodegradables, entre los que se encuentran el ácido poliláctico (PLA), la policaprolactona (PCL) o un copolímero de ambos, conocido como PCLA, presentan el mayor potencial comercial para estas

aplicaciones ya que pueden fabricarse de forma reproducible y económica. Además, los poliésteres son polímeros biocompatibles y biodegradables empleados en la fabricación de distintos dispositivos médicos como puntos de sutura, placas, dispositivos de fijación ósea, stents o tornillos, y también son utilizados comercialmente como vehículos para una distribución controlada de fármacos (Manavitehrani et al., 2016).

Los poliésteres a su vez son modificados para hacer frente a problemas tales como la baja adhesión celular, la hidrofobicidad o efectos secundarios inflamatorios. Por tanto, la modificación de este tipo de polímeros es un tema de gran relevancia en el campo de la ingeniería de materiales (Manavitehrani et al., 2016).

5.1.2. ARMAZONES BIOABSORBIBLES Y AGENTES TERAPÉUTICOS EMPLEADOS

Unos de los principales materiales utilizados para la fabricación de los AB son metales bioabsorbibles como magnesio, hierro, zinc o aleaciones de estos. Los polímeros biodegradables, principalmente poliésteres, constituyen la otra alternativa para la producción de este tipo de dispositivos, siendo el PLA el principal polímero utilizado en sus formas de ácido poli-L-láctico (L-PLA) y ácido poli-D,L-láctico (DL-PLA) (Aljihmani et al., 2019; Sotomi et al., 2017).

En lo que respecta a los agentes terapéuticos se han analizado infinidad de fármacos con actividad antiinflamatoria, inmunosupresora y antiproliferativa. Entre ellos se encuentra el paclitaxel, un antineoplásico que a concentraciones bajas como las utilizadas en este tipo de stents es citostático (Kamath, Barry, & Miller, 2006). El sirolimus y sus derivados también han demostrado beneficios clínicos significativos gracias a su capacidad para bloquear una quinasa celular de vital importancia para la progresión del ciclo celular en células musculares lisas (O. & R., 2001; Serra-Peñaranda, Miranda-Guardiola, & Venegas-Aravena, 2007).

Alternativamente, como opción a considerar, está el estudio de moléculas de origen natural que en análisis previos han demostrado algún tipo de capacidad antiproliferativa similar a la descrita para los compuestos anteriormente mencionados, que las hace susceptibles de emplearse en este tipo de aplicaciones. Existen plantas como el olivo (*Olea europaea*), la vid (*Vitis vinifera*), o el mango (*Mangifera indica* L.), todas con un importante desarrollo en la Comunidad Autónoma Andaluza, que han demostrado ser fuentes de polifenoles y metabolitos con importantes aplicaciones farmacéuticas (Brezoiu et al., 2019; Sanchez-Sanchez, Fernández-Ponce, Casas, Mantell, & de la Ossa, 2017; Xynos et al., 2012).

5.2. COMPUESTOS NATURALES

Los tejidos vegetales, como toda materia viva, se encuentran en un estado constante de síntesis de biomoléculas o metabolitos. Estos productos celulares pueden ser clasificados en metabolitos primarios

(compuestos esenciales para el mantenimiento del estado vital, el crecimiento, el desarrollo y la reproducción) y metabolitos secundarios (no son estrictamente vitales en los tejidos y representan en ocasiones compuestos de desecho metabólico). Los metabolitos secundarios, también conocidos comúnmente como productos naturales, han sido utilizados por el hombre en una gran cantidad de aplicaciones, ya sea como aditivo alimentario, en cosmética, en farmacia, etc (Ringuelet & Viña, 2013). El aumento de enfermedades alérgicas, inflamatorias, cardiovasculares y neurodegenerativas en la sociedad ha puesto de manifiesto el valor de los productos naturales como fuente para tratar distintas patologías dado que sus propiedades bioactivas suponen una alternativa natural y sostenible.

El olivo, el mango y la vid son productos de gran importancia dentro de la industria agroalimentaria andaluza. Sin embargo, el uso de los residuos procedentes de su cultivo (hojas, semillas, tallos, raíces...) o de su procesado alimentario (orujos, alperujos...), dado su elevado contenido en compuestos bioactivos, podría aumentar aún más su ya de por sí elevado valor añadido (Cejudo Bastante et al. 2017).

5.2.1. COMPUESTOS BIOACTIVOS EN HOJAS DE OLIVO

El olivo (*Olea europaea*) se ha cultivado en el Mediterráneo desde hace más de mil años. Los olivares constituyen uno de los cultivos más extendidos, siendo Europa responsable del 65% de la producción mundial. En el año 2014, España fue el principal productor europeo con una cantidad de unos 7 millones de toneladas de aceitunas. Los efectos beneficiosos para la salud de los productos derivados de esta planta son ya ampliamente conocidos (Putnik et al., 2017).

El principal producto obtenido del olivo es el aceite de oliva, ampliamente estudiado por su capacidad antioxidante dada por el elevado número de compuestos fenólicos. Sin embargo, las hojas de olivo también contienen compuestos fenólicos tales como la oleuropeína, luteolina, verbascosido, apigenina e hidroxitirosol (Vogel et al., 2015). Diversos estudios en animales y humanos han demostrado efectos beneficiosos para la salud por parte de estos compuestos como pueden ser capacidad antioxidante (O. H. Lee & Lee, 2010), cardioprotectora (Nekooeian, Khalili, & Khosravi, 2014), antiproliferativa frente a células cancerígenas (Barrajón-Catalán et al., 2015) o antiinflamatoria y analgésica gracias a la acción de la oleuropeína y el hidroxitirosol, procedente de la hidrólisis de esta (Haloui, Marzouk, Marzouk, Bouraoui, & Fenina, 2011).

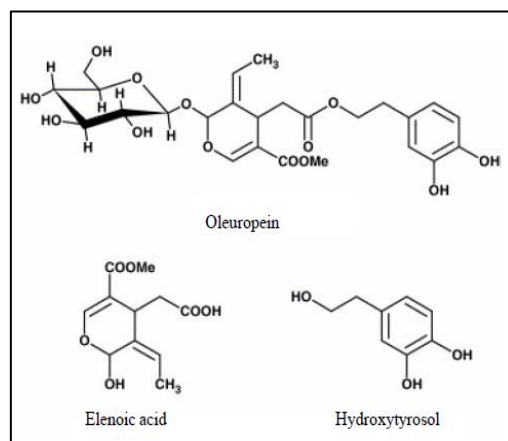


Figura 2. Estructura de la oleuropeína y su metabolito, el hidroxitirosol (Haloui et al., 2011).

5.2.2. COMPUESTOS BIOACTIVOS EN EL HOLLEJO DE UVA TINTA

Otra planta de especial relevancia en nuestro entorno es la vid (*Vitis vinifera*) debido a su impacto económico como resultado de su uso en la producción de vino, zumo de frutas y otros productos alimentarios. Durante el año 2018, España fue el tercer productor vitivinícola a nivel mundial con 44,4 millones de hL de vino. En cuanto a las exportaciones, España ocupó el primer puesto del ranking con un total 21,1 millones de hL que se tradujeron en unos ingresos de 2,9 billones de euros (OIV & International Organisation of Vine and Wine, 2019). Durante la producción vitivinícola, los polifenoles de la uva se transfieren al vino, pero una gran proporción de ellos permanece en los residuos sólidos derivados de este proceso (semillas, piel y raspón). Considerando que el hollejo de uva representa un 20% del peso total de las uvas procesadas, este subproducto constituye una fuente de compuestos bioactivos que puede ser empleados en la obtención de productos cosméticos, farmacéuticos y alimentarios (Brezoiu et al., 2019; Georgiev, Ananga, & Tsoleva, 2014).

Se han encontrado evidencias del potencial anticancerígeno de los compuestos fenólicos presentes en el hollejo, concretamente de su habilidad para inhibir la proliferación de células cancerígenas mediante el bloqueo del ciclo celular y la inducción de la apoptosis (Jara-Palacios et al., 2015) y de su posible uso como agentes quimiopreventivos interfiriendo con la iniciación y posterior progresión tumoral (Araújo, Gonçalves, & Martel, 2011). Las antocianinas presentes en la uva, también tienen un efecto antioxidante y cardioprotector, inhibiendo el proceso inflamatorio así como reduciendo el estrés oxidativo y nitrosativo (S. S. Balea, Pârvu, Pop, Marín, & Pârvu, 2018).

5.2.3. COMPUESTOS BIOACTIVOS EN LAS HOJAS DE MANGO

El mango (*Mangifera indica* Linn), se ha convertido en una de las plantas más consumidas a nivel mundial para el tratamiento de enfermedades. Esta planta pertenece a la familia *Anacardiaceae* y se cultiva en numerosas regiones con climas tropicales y subtropicales (Khumpook, Saenphet, Tragoolpua, & Saenphet, 2019). En España, distintas regiones cumplen con los requisitos climáticos necesarios para el cultivo de este tipo de árboles frutales. Una de ellas es la costa tropical andaluza que comprende varias localidades pertenecientes a las provincias de Málaga y Granada, donde la superficie destinada al cultivo de mango es aproximadamente de unas 1100 hectáreas y la producción anual alcanza las 10.000 toneladas (Barea-Álvarez et al., 2016; Sayadi & Calatrava, 2009).

La corteza y las hojas de mango son ricas en polifenoles como la mangiferina, la quercetina, los ácidos fenocarboxílicos y los galotaninos, que gracias a sus efecto antiinflamatorio y antioxidante, han demostrado actividad quimiopreventiva frente a distintos tipos de células cancerígenas (M. T. Fernández-Ponce et al., 2017). Entre todos estos compuestos destaca la mangiferina, también conocida por su actividad inmunomoduladora. Aunque hasta el momento se habían reportado numerosas propiedades, el mecanismo antitumoral no se había elucidado por completo. Un estudio reciente ha

demostrado sus potentes efectos antimetastáticos y antiangiogénicos, al ser capaz de inhibir los procesos de migración celular, angiogénesis y neovascularización (Delgado-Hernández et al., 2020).

5.3. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN A ALTA PRESIÓN

En lo que respecta a la obtención de estos compuestos bioactivos, termolábiles y presentes en concentraciones bajas, las técnicas de extracción tradicionales no son la opción más adecuada. Estas técnicas precisan de largos tiempos de extracción e implican el consumo de una gran cantidad de muestra y disolventes orgánicos que son costosos y difíciles de conseguir dado su impacto perjudicial sobre el medio ambiente y la salud humana. Otro inconveniente fundamental de las técnicas de extracción tradicionales es que a menudo, los extractos obtenidos requieren pasos de concentración y limpieza previos a su análisis (Mustafa & Turner, 2011).

En los últimos años, nuevas técnicas de extracción como la extracción con fluidos supercríticos (SFE), la extracción con líquidos presurizados (PLE) o la extracción con solvente mejorada (ESE) han sido propuestas como una alternativa válida a los métodos tradicionales. Esto es debido entre otros factores a su elevada eficiencia, a que son respetuosas con el medio ambiente y a sus bajos requerimientos en cuanto a tiempo y consumo de disolvente (M. T. Fernández-Ponce et al., 2017).

La SFE y ESE presentan la necesidad de utilizar cantidades considerables de codisolventes orgánicos para poder optimizar la extracción de compuestos polares como los polifenoles, predominantes en las hojas de olivo y mango y en el hollejo de uva tinta. La extracción con líquidos presurizados representa una alternativa por tanto ideal para la obtención de los compuestos en los que se fundamenta este estudio (M. T. Fernández-Ponce et al., 2017).

5.3.1. EXTRACCIÓN CON LÍQUIDOS PRESURIZADOS (PLE)

La extracción con líquidos presurizados (PLE) implica el uso de solventes líquidos a presión y temperatura elevadas, mejorando de esta manera la eficiencia del proceso extractivo en comparación a las extracciones que se realizan a presión atmosférica y a temperatura ambiente. El uso de solventes a temperaturas superiores a su punto de ebullición permite un incremento de la solubilidad y la transferencia de materia (Mustafa & Turner, 2011).

La temperatura constituye un parámetro de operación fundamental por lo que es necesario optimizarlo. El incremento de temperatura se traduce en una mejora de la velocidad de difusión, de la solubilidad de los analitos en el disolvente y del rendimiento de la extracción al disminuir la viscosidad de los disolventes, permitiendo una mejor penetración del mismo en las partículas de la matriz, y romper las interacciones soluto-matriz (Fernández Álvarez, 2009). No obstante, es necesario tener en cuenta que temperaturas demasiado elevadas (por encima de 100°C) podrían ser perjudiciales como consecuencia del carácter termolábil de muchos polifenoles (Fernández-Ponce et al. 2015).

Otro parámetro de importancia es la presión de trabajo, cuyo incremento permite que el disolvente permanezca en estado líquido a temperaturas superiores a las de su punto de ebullición. El contacto disolvente-analito también se ve favorecido al reducirse la tensión superficial del disolvente, incrementarse la penetración del disolvente en los poros de la matriz y la solubilización de las burbujas de aire (M^a Teresa Fernández-Ponce et al., 2015).

Generalmente, los disolventes utilizados en las extracciones con líquidos presurizados son el metanol, agua, acetona y hexano. En caso de emplear agua como disolvente, el método de extracción se denomina extracción con agua subcrítica (SWE) (Oreopoulou, Tsimogiannis, & Oreopoulou, 2019). Centrándonos en la extracción de polifenoles, la eficiencia de un disolvente depende principalmente de su capacidad para disolver grupos fenólicos específicos. El metanol y el etanol son los disolventes mayoritariamente utilizados para extracciones cuantitativas de polifenoles. Alternativamente, también hay evidencias de que el incremento de la polaridad del disolvente al utilizar disoluciones hidroalcohólicas se traduce en un mayor rendimiento de extracción de compuestos fenólicos (B. B. Li, Smith, & Hossain, 2006; Stoica, Senin, & Ion, 2013; Yang & Zhang, 2008).

5.4. MÉTODOS DE FIJACIÓN DEL AGENTE TERAPÉUTICO

Una alternativa al tratamiento farmacológico clásico al que suelen someterse los pacientes tras el implante de cualquier dispositivo médico para reducir el malestar o el riesgo de infección, sería la incorporación del agente terapéutico (API) en el propio implante, convirtiéndolo en un sistema de liberación local del fármaco (M. Champeau, Thomassin, Tassaing, & Jérôme, 2015).

Como norma general, la incorporación de compuestos bioactivos en matrices poliméricas se ha llevado a cabo durante los procesos de síntesis o procesamiento de los polímeros o mediante inmersión y remojo en una solución con las sustancias de interés. A pesar de su simplicidad, estas técnicas presentan una serie de inconvenientes como pueden ser reacciones no deseadas entre determinados compuestos, degradación térmica de los mismos como consecuencia de las elevadas temperaturas necesarias durante dichos procesos, porcentajes de impregnación bajos, problemas de dispersión heterogénea y derivados del uso de disolventes orgánicos tóxicos que deben ser eliminados de la matriz tras el proceso de impregnación para cumplir con los requisitos de salud y seguridad del producto (Fernández-Ponce et al. 2018).

La necesidad de solventar estos problemas asociados a los métodos tradicionales ha impulsado el desarrollo de nuevas técnicas para la incorporación de los agentes terapéuticos. La impregnación mediante fluidos supercríticos (FSC), especialmente la impregnación asistida mediante dióxido de carbono supercrítico (CO₂SC), ha demostrado ser una alternativa factible y respetuosa con el medio ambiente a la hora de generar matrices poliméricas cargadas con fármacos (Duarte et al., 2007).

5.4.1. IMPREGNACIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Un fluido supercrítico (FSC) puede definirse como aquel que se encuentra a una presión y una temperatura superiores a los valores correspondientes a su punto crítico (figura 3), de manera que es muy difícil distinguir entre las fases líquida y gaseosa. Los FSC presentan propiedades fisico-químicas intermedias entre líquidos y gases. En comparación con los disolventes tradicionales, la baja viscosidad, la elevada difusividad de los solutos en este tipo de fluidos y su gran reactividad favorecen los procesos de transferencia de materia, justificando el excelente papel que desempeñan como disolventes (K. Li & Xu, 2019).

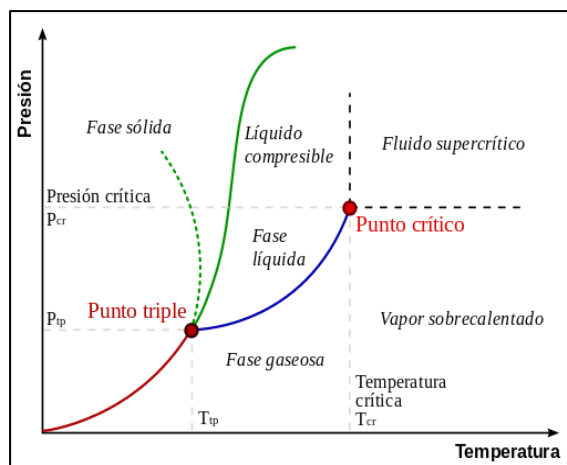


Figura 3. Diagrama de fases típico (Fundación Wikimedia Inc., s. f.)

El CO_2SC es el disolvente mayoritariamente utilizado dadas sus condiciones de operación relativamente bajas (temperatura crítica: $T_c = 31^\circ\text{C}$ y presión crítica: $P_c = 73,8$ bar), convirtiéndolo en una opción más económica que otros disolventes. El CO_2SC posee una buena solubilidad en numerosos polímeros y es capaz de solubilizar diversos API introduciéndolos en su matriz. Además, es respetuoso con el medioambiente, químicamente inerte, no inflamable y fácil de eliminar de la matriz polimérica como un gas mediante una etapa de despresurización tras la impregnación, obteniendo un producto seco y sin restos de disolvente. El estado supercrítico del CO_2 se alcanza a una temperatura relativamente baja, siendo el proceso de impregnación compatible con sustancias o compuestos termolábiles (M. Champeau et al., 2015; Mathilde Champeau, Thomassin, Tassaing, & Jerome, 2015).

Además de las condiciones de presión y temperatura, que pueden controlarse para modificar la difusividad y la densidad del disolvente confiriéndole una mayor versatilidad, otras variables importantes durante el proceso de impregnación son la presencia de codisolventes polares como el etanol que aumenten la solubilidad de determinados compuestos en el CO_2SC , el tiempo de operación y la velocidad de despresurización (M. T. Fernández-Ponce et al., 2018).

La impregnación asistida mediante CO_2SC ha sido utilizada para depositar tanto fármacos en solitario como mezclas de estos en caso de que se consiga un mayor efecto terapéutico. Aunque, la utilización de esta tecnología para la creación de soportes vasculares poliméricos es relativamente reciente es posible encontrar diversos estudios en la bibliografía analizando la efectividad de distintos soportes en la liberación controlada de fármacos (Milovanovic et al., 2019), regeneración tisular (Savaris et al., 2019) y estenosis arterial (Dong et al., 2018).

6. OBJETIVOS

Este TFG se realizó bajo la tutorización de los profesores Dr. Casimiro Mantell Serrano del grupo de investigación de “Análisis y Diseño de Procesos de Fluidos Supercríticos”, del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología de los Alimentos y la Dra. M^a Carmen Durán Ruiz del Departamento de Biotecnología, Biomedicina y Salud Pública. Dicho trabajo de investigación se enmarca dentro de un Proyecto más amplio titulado “Desarrollo de *stents* poliméricos bio-reabsorbibles y farmacoactivos utilizando técnicas de impresión 3D e impregnación supercrítica” que están desarrollando de forma colaborativa ambos grupos de investigación.

El objetivo general de la presente propuesta de TFG es realizar un análisis de la impregnación supercrítica de matrices poliméricas de PLA con extractos naturales obtenidos a partir de residuos de la industria agroalimentaria como son las hojas de mango, las hojas de olivo y el hollejo de uva tinta y su posterior capacidad a la hora de generar un proceso de endotelización controlada.

Los objetivos específicos fijados para el desarrollo de dicho objetivo global son:

1. Evaluar la influencia del disolvente empleado (agua o etanol presurizados) en el proceso de extracción a alta presión de las materias primas mencionadas.
2. Caracterizar los extractos obtenidos desde el punto de vista químico (rendimiento del proceso extractivo, polifenoles totales y contenido en antocianos) y funcional (actividad antioxidante).
3. Definir la influencia del extracto utilizado en el proceso de impregnación supercrítica del PLA. La carga de impregnación, la actividad antioxidante y el rendimiento del proceso serán los parámetros analizados.
4. Analizar mediante microscopía electrónica de barrido las posibles modificaciones estructurales surgidas en el polímero tras el proceso de impregnación con fluidos supercríticos.
5. Evaluar el efecto de los extractos obtenidos, así como del material impregnado, sobre la viabilidad celular mediante ensayos *in vitro*.

7. SOLUCIÓN TÉCNICA

A lo largo de este apartado se irán describiendo los materiales y reactivos necesarios para llevar a cabo el procedimiento experimental, la metodología seguida durante el mismo, así como los resultados obtenidos, que posteriormente serán discutidos.

7.1. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1.1. MATERIAS PRIMAS

Las materias primas a partir de las cuales se obtuvieron los extractos naturales empleados en las impregnaciones fueron hojas de olivo (*Olea europaea*), hollejo de uva tinta (*Vitis vinifera*) de la variedad Petit Verdot y hojas de mango (*Mangifera indica* L.) de la variedad Kent. Las dos primeras materias fueron recolectadas en 2019 y proporcionadas por la Olivarera San José de Lora de Estepa S.Coop. And. (Sevilla, España) y por Bodegas Luis Pérez (Jerez, España) respectivamente. En el caso de las hojas de mango, estas fueron obtenidas en 2018 y suministradas por el Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea ‘La Mayora’ (IHSM) ubicado en Málaga (España), perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

A modo de pretratamiento, tanto las hojas de olivo y de mango como el hollejo fueron secadas a temperatura ambiente, guardadas en ausencia de luz y posteriormente trituradas (figura 4), consiguiendo así un mayor contacto entre la materia orgánica y el disolvente al reducir el tamaño de las partículas y facilitando por tanto la extracción.

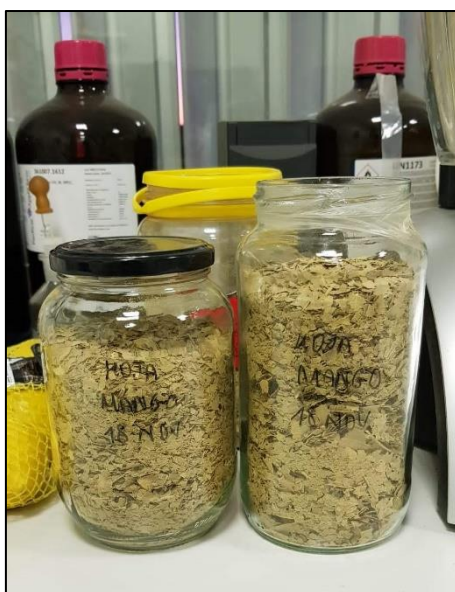


Figura 4. Hojas de mango trituradas.

7.1.2. REACTIVOS Y MATERIALES

- **2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)** → De la casa *Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania)*. Utilizado para la determinación de la actividad antioxidante.
- **Acetona** → De la casa *Panreac AppliChem (Darmstadt, Alemania)*, con pureza del 99,9%. Utilizada en la limpieza de materiales y equipos.
- **Ácido poliláctico (PLA)** → Filamento para impresión 3D de 1,75 mm de diámetro nominal proporcionado por la marca BQ de *Mundo Reader, SL. (Madrid, España)*.

Tabla 1. Propiedades del filamento de PLA proporcionado por BQ (BQ, s. f.).

PROPIEDAD	VALOR	UNIDADES	MÉTODO DE TESTEO
Propiedades generales			
Densidad	1,24	g/cm ³	ASTM D792
Propiedades mecánicas			
Módulo elástico en flexión	3600	MPa	ISO 178
Resistencia a la flexión	108	MPa	ISO 178
Dureza Sh D	85	Sh D	ASTM D2240
Propiedades térmicas			
Temperatura de flexión bajo carga	56	°C	ISO 75/2B
Temperatura de fusión	145-160	°C	ASTM D3418
Temperatura de transición vítrea	56-64	°C	ASTM D3418



Figura 5. PLA suministrado por BQ

- **Ácido gálico monohidratado:** De la casa *Sigma-Aldrich*, con pureza del 98%. Necesario a la hora de analizar el contenido de polifenoles totales.
- **Agua destilada y agua miliQ** → Empleadas para el proceso de extracción y los análisis de polifenoles, antocianos y las pruebas de actividad antioxidante.
- **Dióxido de carbono (CO₂)** → De la empresa *Abelló Linde (Barcelona, España)* con un 99,99% de pureza. Utilizado en el proceso de impregnación con fluidos supercríticos.
- **Etanol (EtOH)** → De la casa *Panreac AppliChem*, con pureza del 96%. Disolvente polar utilizado durante las extracciones y las impregnaciones.
- **Medio basal de células endoteliales-2 (EBM®-2)** → Suministrado por la casa *Lonza (Verviers, Bélgica)*. Utilizado para el crecimiento y mantenimiento de los cultivos celulares con células endoteliales.
- **Reactivo de Folin-Ciocalteu** → De la casa *Sigma-Aldrich*. Utilizado para el análisis de polifenoles totales.
- **Tampón fosfato salino de Dulbecco (DPBS)** → De la casa *Biowest (Nuaille, Francia)*. Utilizado para lavar y resuspender las células durante el proceso de disociación del cultivo.
- **Tripsina-EDTA 10X** → Suministrada por *Biowest*. Necesaria para disgregar la monocapa celular.

Otros reactivos utilizados son: Na₂CO₃ 10%, HCl concentrado, CH₃COONa y KClO₃.

7.1.3. EQUIPOS

○ Equipos de alta presión

Los procesos de extracción con líquidos presurizados y de impregnación fluidos supercríticos se llevaron a cabo en distintas plantas de alta presión a escala de laboratorio de *Thar Technologies Inc* (Pittsburgh, PA, USA). Sus componentes son los siguientes:

- **Extractor** → Recipiente cilíndrico de acero inoxidable de volumen variable. Los modelos utilizados para la PLE fueron el SF1000 y el SF2000, con capacidad para 1L y 2L respectivamente. A lo largo de las impregnaciones se utilizó el modelo SF100 (figura 6) con capacidad para 100 mL. La presión del reactor puede controlarse mediante un manómetro y permanece estable gracias a un dispositivo de cierre hermético. También dispone de una camisa calefactora y de dos termopares que permiten controlar las temperaturas interna y externa.



Figura 6. Imagen de la planta piloto SF100 de Thar Technologies Inc.

- **Bombas de alta presión** → La planta cuenta con 2 bombas de líquidos a alta presión modelo P50 de doble pistón de la casa *Thar Technologies Inc*, cuyo objetivo es impulsar el codisolvente y el CO₂. Para poder bombear el CO₂ es necesario que se encuentre en estado líquido, por lo que la bomba de CO₂ dispone de un criotermostato para enfriarlo a temperaturas inferiores a 5°C. Antes de la entrada al reactor se dispone de un intercambiador de calor de alta presión para precalentar el CO₂ a la temperatura de trabajo.
- **Válvula reguladora de presión (BPR)** → Válvula de seguridad situada tras el extractor que permite regular y mantener la presión de trabajo en el interior de este. Además, se encuentra termostatizada para evitar la congelación por despresurización del CO₂.
- **Precalentador** → Intercambiador de calor a alta presión previo al extractor. Su finalidad es llevar el disolvente a la temperatura de trabajo.
- **Separador ciclónico** → Recipiente de acero inoxidable de 500 mL de capacidad, empleado para recoger los extractos obtenidos cuando se opera en continuo.

- **Válvulas y tuberías** → El sistema se encuentra conectado por completo mediante una serie de válvulas y tuberías de acero inoxidable de 1/8 pulgadas de diámetro.
- **Software** → El software “Process Suite” proporcionado por el propio fabricante, permite controlar la presión, la temperatura y los caudales de CO₂ y de codisolvente.

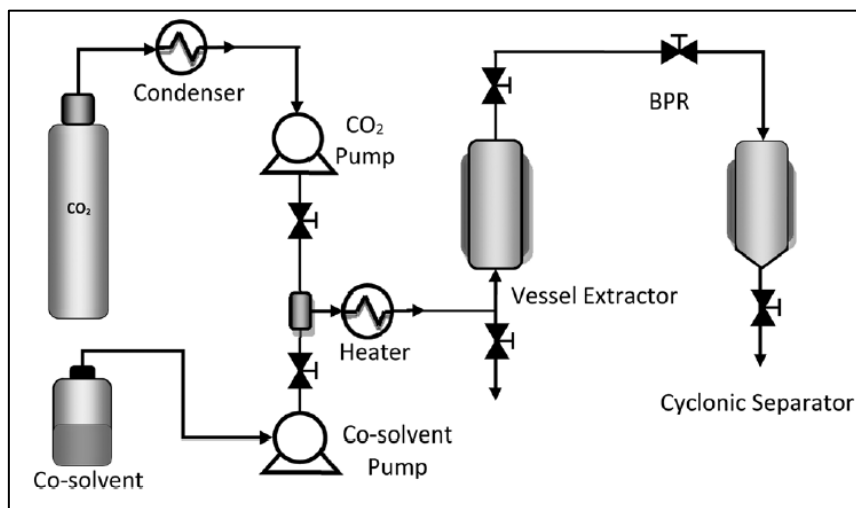


Figura 7. Diagrama esquemático de un equipo de alta presión (M. T. Fernández-Ponce et al., 2017).

- **Agitador magnético IKA® RCT Classic de Thar Technologies Inc** → Empleado durante el proceso de impregnación para aumentar la homogeneidad de las muestras.
- **Baño de ultrasonido Modelo 514. (50 KhZ) de SELECTA** → Preparación de la disolución madre de DPPH para el análisis de la actividad antioxidante.
- **Balanza de precisión Mettler Toledo AG135** → Peso en seco de los extractos para determinar sus concentraciones y el rendimiento del proceso.
- **Balanza Gram-precisión serie STB-8K** → Peso de reactivos.
- **Cabina de seguridad biológica Bio II Advance de Telstar** → Manipulación de los cultivos celulares.
- **Contador automático de células TC20® de Bio-Rad** → Determinación de la concentración de las suspensiones celulares.
- **Espectrofotómetro UVmini-1240 de Shimadzu Scientific Instruments** → Medidas espectrofotométricas para determinar la actividad antioxidante del PLA impregnado.
- **Impresora 3D ANYCUBIC Mega S** → Impresión aditiva de discos de PLA para su posterior impregnación.
- **Lector de microplacas Epoch2 de BioTek Instruments** → Medidas espectrofotométricas para determinar el contenido de antocianos, polifenoles y la actividad antioxidante.

- **Microscopio electrónico de barrido Nova NanoSEM 450** → De la casa *FEI (Hillsboro, Oregón, Estados Unidos)*. Estudio de microscopía electrónica de barrido (SEM) para evaluar cambios estructurales en el polímero tras el proceso de impregnación.
- **Microscopio invertido AE2000 Series** → De la casa *Motic (Xiamen, China)*. El microscopio tiene acoplada una cámara (Moticam 3+) del mismo fabricante que permitió la captura de imágenes de los cultivos.
- **Microscopio invertido IX81** → De la casa *Olympus (Tokio, Japón)*. Captura de imágenes del cultivo celular durante los ensayos de proliferación.
- **Rotavapor Laborota 4000-efficient de Heidolph** → Evaporación de disolventes de los extractos para determinar su concentración y el rendimiento del proceso.

7.1.4. METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN CON LÍQUIDOS PRESURIZADOS

Las PLE se realizaron en los equipos de la firma Thar Technologies descritos anteriormente. En el caso de las hojas de mango y el hollejo de uva tinta, los extractos tanto con agua miliQ como con EtOH se obtuvieron en la planta SF2000. Las extracciones a partir de hojas de olivo, con ambos disolventes, se realizaron en la planta SF1000.

Antes de comenzar con el proceso de extracción, es necesario un proceso de purga previo para evitar la presencia de burbujas de aire en las conducciones del equipo. A continuación, la materia orgánica triturada se introduce en un cartucho de papel de unas dimensiones adecuadas al tamaño del reactor, que posteriormente se cierra conectando todas las conexiones necesarias.

Tabla 2. Masa de los cartuchos usados en la extracción de las diferentes materias primas.

	Mango		Olivo		Hollejo	
	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH
Masa (g)	330,1	490,4	105,6	113,6	511,9	551,5

Una vez que la planta estaba lista para operar, mediante el software ‘‘Process Suite’’, proporcionado por el propio fabricante, se establecieron el caudal de la bomba de codisolvente, así como las condiciones de temperatura ($T = 80^{\circ}\text{C}$) y presión de trabajo ($P = 200$ bar). El proceso se realizó en estático con una duración de 12 h, favoreciendo así el enriquecimiento del extracto en los compuestos de interés. Dichas condiciones se fijaron teniendo en cuenta diversos estudios previos realizados por el grupo de investigación (M^a Teresa Fernández-Ponce et al., 2015, 2016).

Una vez definidos los parámetros de operación, se comienza a bombear agua miliQ o EtOH hasta alcanzar la presión fijada que se mantiene constante gracias a la válvula BPR. En este momento se detiene el funcionamiento de la bomba y se deja el proceso de extracción durante el tiempo que sea

necesario. Cuando el proceso finaliza se apagan las temperaturas del sistema, se despresuriza y se recuperan los extractos. Entre cada proceso extractivo se limpian las plantas con acetona.

7.1.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS

7.1.5.1. Rendimiento de la extracción

El rendimiento es un parámetro que permite determinar la masa de extracto seco obtenida a partir de la materia prima empleada inicialmente. Para ello se toman alícuotas de volumen conocido de cada uno de los extractos, se secan en el rotavapor y por diferencia de pesos entre el matraz vacío y aquel que contiene el extracto seco, se determina la masa de extracto seco contenido en el volumen correspondiente a las alícuotas empleadas. A partir de estos valores podemos calcular la concentración del extracto y posteriormente el rendimiento de la extracción al considerar el volumen total de extracto obtenido como queda reflejado en las ecuaciones [1] y [2].

$$\text{Concentración del extracto } \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}} \right) = \frac{m_{\text{extracto seco}} (\text{g})}{V_{\text{alícuota}} (\text{mL})} \quad [1]$$

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Concentración del extracto } \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}} \right) \times V_{\text{total de extracto}} (\text{mL})}{\text{Masa inicial de materia prima (g)}} \times 100 \quad [2]$$

7.1.5.2. Determinación del contenido total de polifenoles (TPC)

Para determinar el contenido total de polifenoles (TPC) de cada uno de los extractos se realizó un ensayo basado en el método de Folin-Ciocalteu. Antes de comenzar con el ensayo propiamente dicho, fue necesario preparar una recta patrón con ácido gálico monohidratado para poder determinar la concentración de polifenoles en cada una de las muestras. Para ello, partiendo de una solución madre de ácido gálico de 1000 ppm ($\mu\text{g/mL}$), se prepararon varias diluciones seriadas con distintas concentraciones que iban desde las 300 hasta las 25 ppm, utilizando agua miliQ como disolvente.

Para el análisis se utilizaron distintas concentraciones de cada uno de los extractos (tabla 3) por triplicado. El volumen a añadir de cada uno de los reactivos en los pocillos es variable en función de si se trata de:

- **Muestra** → 200 μL agua miliQ + 12,5 μL extracto + 12,5 μL reactivo de Folin-Ciocalteu.
- **Patrón** → 200 μL agua miliQ + 12,5 μL patrón + 12,5 μL reactivo de Folin-Ciocalteu.
- **Control** → 200 μL agua miliQ + 12,5 μL agua miliQ/EtOH + 12,5 μL reactivo de Folin-Ciocalteu.
- **Blanco** → 200 μL agua miliQ + 25 μL agua miliQ/EtOH.

Tabla 3. Concentraciones de las diluciones de extractos analizadas.

		Concentración (µg/mL o ppm)
Mango	Agua miliQ	1000
		500
	EtOH	375
		281,25
		210,94
Olivo	Agua miliQ	3000
		2000
	EtOH	3000
		2000
Hollejo	Agua miliQ	5000
		2500
	EtOH	2000
		1000

La placa se mantuvo en agitación y se dejó que la reacción transcurriese durante 2 h. Una vez pasado este tiempo, se detuvo la reacción mediante la adición de 25 µL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) a cada uno de los pocillos. Por último, con ayuda del lector de microplacas Epoch2 (*BioTek Instruments*) se midió la absorbancia a una longitud de onda de 725 nm.

Conocidas ya las absorbancias, se elaboró la recta patrón, representando la absorbancia frente a la concentración de ácido gálico (figura 8).

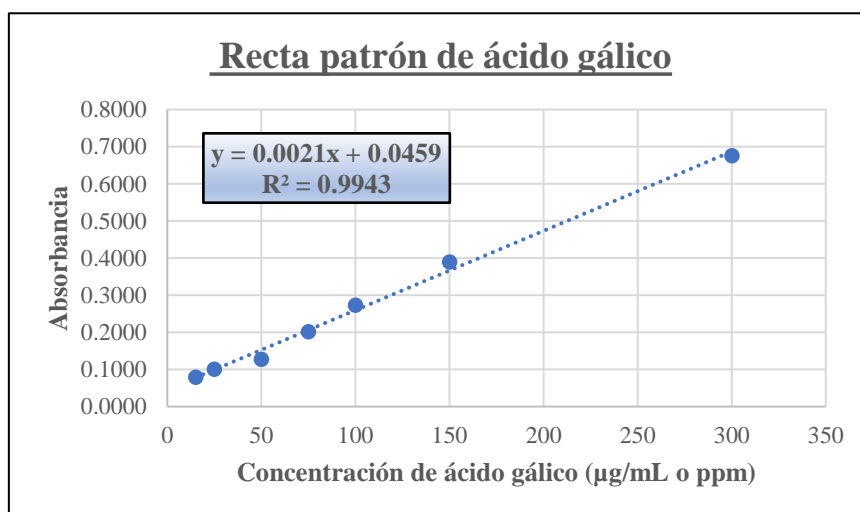


Figura 8. Recta patrón de ácido gálico.

Tomando los valores de absorbancia de cada una de las muestras de extracto e interpolando en la ecuación de la recta patrón, podemos determinar la concentración equivalente de ácido gálico (µg/mL). La concentración de polifenoles en los extractos originales se determina según se indica en la ecuación [3], estando el resultado final expresado en µg equivalentes de ácido gálico (AGEq)/100 µg extracto.

$$\left(\frac{\text{AGEq } (\mu\text{g})}{100 \mu\text{g extracto}} \right) = \alpha \times \frac{V_{\text{total de la reacción}} (\mu\text{L})}{V_{\text{extracto en la reacción}} (\mu\text{L})} \cdot \frac{1}{[\text{]}_{\text{dilución}} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right)} \cdot 100 \quad [3]$$

- α → Concentración de ácido gálico resultante de interpolar las absorbancias obtenidas en la ecuación de la recta patrón ($\mu\text{g/mL}$).
- $V_{\text{total de la reacción}}$ → El volumen total en cada uno de los pocillos es de 250 μL .
- $V_{\text{extracto en la reacción}}$ → El volumen de extracto en cada uno de los pocillos es de 12,5 μL .

7.1.5.3. Determinación del contenido total de antocianos (TAC)

Para determinar el contenido total de antocianina monomérica (AM), se utilizó un método diferencial de pH. Este se basa en el cambio estructural reversible que experimenta el grupo cromóforo de la antocianina cuando se pasa de pH 1,0 a pH 4,5. La diferencia de absorbancia que presenta el pigmento a estos valores de pH es proporcional a la concentración del mismo (J. Lee, Durst, & Wrolstad, 2005).

Para este ensayo fueron necesarios exclusivamente los extractos de hollejo de uva tinta. Dada su elevada concentración inicial, se preparó una dilución de 8000 ppm para el extracto con agua miliQ y otra de 2000 ppm para el extracto de etanol. Ambas diluciones se combinaron en proporción 1:5 con dos soluciones tampón, preparadas previamente, cuyo pH se ha ajustado con HCl concentrado:

- Cloruro de potasio (KCl) 0,4M a pH = 1.
- Acetato de sodio ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 0,025M a pH = 4,5.

La absorbancia de las diluciones extracto-tampón se midió en un lector de microplacas (Epoch2, BioTek) a una longitud de onda de 520 y 700 nm. Conocidos estos valores se determina la absorbancia de la muestra diluida (A) mediante la ecuación [4]:

$$A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 4,5} \quad [4]$$

Una vez que hemos determinado el valor de la absorbancia, podremos calcular la concentración de los pigmentos de antocianina monomérica en la muestra original por medio de la ecuación [5]:

$$\text{Antocianina monomérica} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g extracto}} \right) = \frac{(A \times \text{PM} \times \text{FD} \times 1000) / (e \times 0,71)}{[\text{]}_{\text{extracto}} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right)} \quad [5]$$

- \underline{A} → Absorbancia de la muestra diluida.
- $\underline{\text{PM}}$ → Peso molecular de la antocianina predominante en la muestra. En nuestro caso, se trata de la cianidina 3-glucósido (449,2 g/mol).
- $\underline{\text{FD}}$ → Factor de dilución de los tampones. Las diluciones realizadas con los tampones a partir de los extractos son 1:5. Se multiplica por 1000 para convertir los gramos en miligramos.

- $\epsilon \rightarrow$ Absortividad molar de la antocianina predominante en la muestra. En nuestro caso, pipeteamos un volumen de 250 μL en la microplaca, por lo que la absortividad tiene un valor de 26900 $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.
- $\text{[L]}_{\text{extracto}} \rightarrow$ Partimos de los valores calculados inicialmente para los extractos de hollejo de uva tinta con agua miliQ y hollejo de uva tinta con EtOH (46225 y 37775 ppm respectivamente) pero expresados en $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

7.1.5.4. Determinación de la actividad antioxidante

El análisis de la capacidad antioxidante se realizó siguiendo los métodos descritos por Brand-Williams y Scherer & Godoy (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995; Scherer & Godoy, 2009). Ambos están basados en la reducción del radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) como consecuencia de su interacción con los compuestos de interés que forman parte de los distintos extractos. En su forma de radical estable, el DPPH presenta coloración púrpura y una banda de absorción a 515 nm. Sin embargo, cuando se reduce como consecuencia de la actividad de un compuesto antioxidante esta banda desaparece y la coloración se transforma en amarilla.

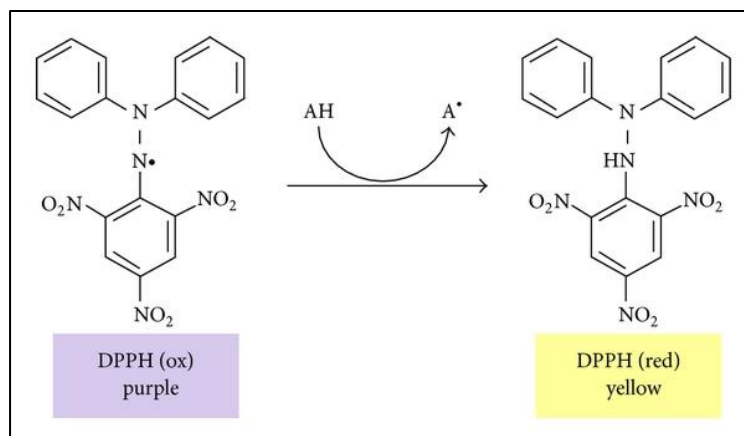


Figura 9. Reacción de oxidación del DPPH en presencia de un compuesto antioxidante (Teixeira, Gaspar, Garrido, Garrido, & Borges, 2013).

Como punto de partida se preparó una disolución madre de DPPD a concentración $6\cdot 10^{-4}\text{M}$ utilizando etanol 96% como disolvente, que se guardó en frío y en ausencia de luz para evitar su degradación. Durante la preparación de la misma, se utilizó un baño de ultrasonidos (Modelo 514. de SELECTA) para facilitar la disolución del reactivo. Para cada uno de los ensayos a realizar, mediante dilución de la solución madre, se preparó una disolución de trabajo a concentración $6\cdot 10^{-5}\text{M}$.

El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos. Por cada uno de los extractos se analizaron por duplicado 6 muestras a distintas concentraciones (ver tabla 4). El contenido de los pocillos varía según se trate de un extracto, un control o el blanco:

- **Muestra** → 293 µL DPPH + 7µL extracto.
- **Control** → 292 µL DPPH + 7 µL agua miliQ o EtOH.
- **Blanco** → 300 µL EtOH (disolvente empleado para la disolución de DPPH).

El tiempo de reacción fue de 2 horas, durante las que en intervalos de 5 minutos se midió la absorbancia a 515 nm (lector de microplacas Epoch2, BioTek) hasta el determinar el punto en el que se alcanza el estado estacionario. Con los datos de absorbancias inicial y final, siguiendo la ecuación [6], podemos determinar el porcentaje de DPPH remanente.

$$\% \text{ DPPH remanente} = \frac{\text{Absorbancia}_{\text{final}}}{\text{Absorbancia}_{\text{inicial}}} \times 100 \quad [7]$$

También es importante determinar la concentración real de los extractos en la reacción por medio de la ecuación [8].

$$\text{Concentración}_{\text{real}} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \text{ o ppm} \right) = \text{Concentración}_{\text{extracto}} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \text{ o ppm} \right) \times \frac{7 \text{ µL extracto}}{300 \text{ µL totales}} \quad [8]$$

Tabla 4. Concentraciones de los extractos usados en el ensayo de actividad antioxidante.

	Extractos con agua miliQ (µg/mL o ppm)		Extractos con EtOH (µg/mL o ppm)	
	Concentración teórica	Concentración en la reacción	Concentración teórica	Concentración en la reacción
Mango	2000.00	46.67	281.25	6.56
	1000.00	23.33	210.94	4.92
	500.00	11.67	158.20	3.69
	250.00	5.83	118.65	2.77
	125.00	2.92	66.74	1.56
	62.50	1.46	37.54	0.88
Olivo	3000.00	70.00	3000.00	70.00
	2000.00	46.67	2000.00	46.67
	1000.00	23.33	1000.00	23.33
	500.00	11.67	500.00	11.67
	250.00	5.83	250.00	5.83
	125.00	2.92	125.00	2.92
Hollejo	5000.00	116.67	2000.00	46.67
	2500.00	58.33	1000.00	23.33
	1250.00	29.17	500.00	11.67
	625.00	14.58	250.00	5.83
	312.50	7.29	125.00	2.92
	156.25	3.65	62.50	1.46

A continuación, se representa el porcentaje de DPPH remanente frente a la concentración real del extracto en la reacción, obteniéndose una gráfica (figura 10) a partir de la que se puede calcular el valor del parámetro conocido como EC_{50} o concentración efectiva. Este parámetro hace referencia a la concentración necesaria del extracto para inhibir el 50% de la actividad del radical DPPH. Cuanto menor sea el valor del parámetro EC_{50} , mayor capacidad antioxidante tendrá el extracto. Aunque el EC_{50} sea característico de cada sustancia, presenta el inconveniente de depender de la concentración de DPPH.

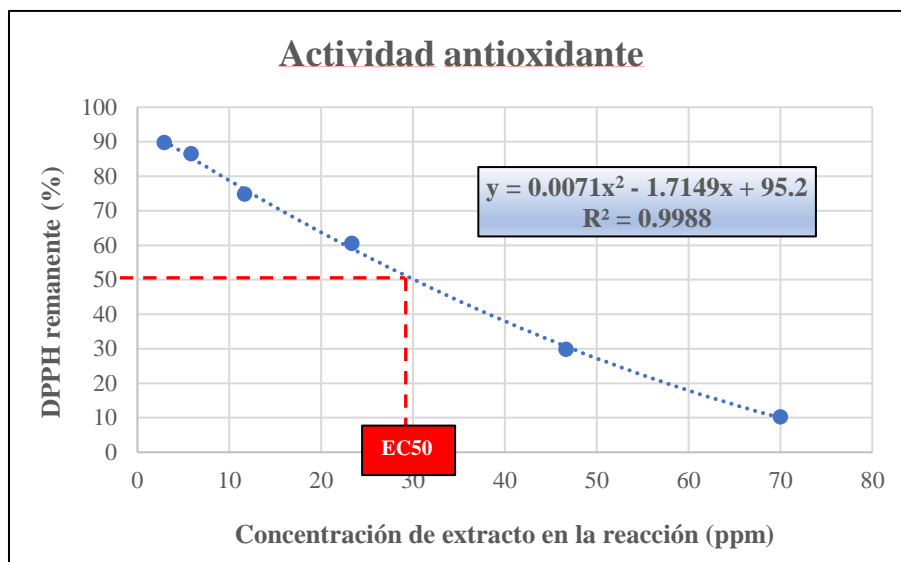


Figura 10. Representación gráfica del porcentaje de DPPH remanente frente a la concentración de extracto en la reacción y cálculo gráfico del valor de EC_{50} . Datos pertenecientes al extracto de hojas de olivo con EtOH.

Otra alternativa a la hora de determinar la actividad antioxidante es el índice de actividad antioxidante (AAI) como se indica en la ecuación [9]. Al tratarse de un parámetro estandarizado, se elimina la dependencia de la concentración inicial del DPPH. En el caso de analizar el AAI, al contrario de lo que ocurre con el EC_{50} , un mayor valor de éste indica que la actividad antioxidante del extracto es mayor. Además, es posible clasificar los extractos según su AAI en: extractos con actividad pobre ($AAI < 0,5$), con actividad moderada ($0,5 < AAI < 1$), con actividad potente ($1 < AAI < 2$) y extractos con actividad muy potente ($AAI > 2$) (Scherer & Godoy, 2009).

$$AAI = \frac{[DPPH] \text{ en la reacción}}{EC_{50}} \quad [9]$$

Para poder calcular el AAI debemos determinar previamente la concentración de DPPH en la reacción por medio de la ecuación [10].

$$[DPPH] \text{ en la reacción} = 6 \cdot 10^{-5} \text{ M} \times \frac{394,32 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \times \frac{10^6 \mu\text{g}}{1 \text{ g}} \times \frac{1 \text{ L}}{10^3 \text{ mL}} \times \frac{293 \mu\text{L DPPH}}{300 \mu\text{L totales}} = 23,107 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \quad [10]$$

7.1.6. METODOLOGÍA DE IMPREGNACIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

El proceso de impregnación mediante fluidos supercríticos se llevó a cabo en la planta SF100 de *Thar Technologies Inc.* Como producto de impregnación se utilizaron los extractos de mango, olivo y hollejo de uva tinta obtenidos con etanol como disolvente, dado que fueron los que mostraron mejores resultados tras su caracterización. Se prepararon diluciones para que todos los extractos se encontrasen a una concentración de 20250 ppm o $\mu\text{g/mL}$.

El procedimiento experimental para poder realizar las impregnaciones comienza con definir como punto de consigna del criotermostato la temperatura de 5°C , para de esa forma condensar el CO_2 y conseguir así su bombeo. A continuación, en la parte inferior del reactor se introduce un determinado volumen de extracto. En nuestro caso, las impregnaciones se realizaron al 5%, por lo que se añadieron 5 mL de los extractos etanólicos (la capacidad del reactor es de 100 mL). En cuanto al polímero a impregnar, para evitar que estuviera en contacto directo con el extracto en el interior del reactor, este se dispone horizontalmente sobre un soporte metálico helicoidal (figura 11). Concretamente, en cada tanda de impregnación se introducen en el equipo 4 fragmentos cuadrados ($1,3 \times 1,3$ cm) de PLA fabricados mediante impresión 3D (impresora 3D ANYCUBIC Mega S). Antes de cerrar el reactor se introduce un sistema de agitación magnética (Agitador magnético IKA® RCT Classic).

Una vez que el equipo se ha cerrado, mediante el software “Process Suite” se seleccionan las temperaturas ($T = 55^{\circ}\text{C}$) y la presión de trabajo ($P = 250$ bar), así como la velocidad de despresurización ($v_{\text{desp}} = 120$ bar/min). Es importante destacar que se va a trabajar en discontinuo, por lo que para garantizar que la BPR permanezca cerrada durante todo el proceso, la presión fijada debe ser unos 50 bar superior a la de trabajo. En el momento en que las temperaturas sean 10°C inferiores a las marcadas y el criotermostato alcance los 5°C , se abre la botella de CO_2 y se acciona la bomba correspondiente hasta que se alcance la presión de trabajo, que se mantendrá gracias a la BPR durante las 3 horas que dura el proceso de impregnación

Transcurrido el tiempo de impregnación, se apaga la bomba, se cierra la botella de CO_2 y se inicia la etapa de despresurización. Una vez despresurizado y enfriado por completo, se abre el reactor y se obtienen las muestras de PLA ya impregnadas.



Figura 11. Muestras de PLA impregnadas sobre el soporte metálico.

7.1.7. CARACTERIZACIÓN DE LOS POLÍMEROS IMPREGNADOS

7.1.7.1. Estudios de microscopía electrónica de barrido

Con el objetivo de determinar cualquier posible cambio estructural experimentado por el polímero tras el proceso de impregnación asistida mediante CO₂ supercrítico, se analizaron distintas muestras mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

Las muestras de PLA sin procesar e impregnadas con los extractos etanólicos de olivo, mango y hollejo se sometieron a un proceso de metalizado antes de la obtención de las imágenes con el microscopio Nova NanoSEM 450 de *FEI*, disponible en los Servicios Centrales de Investigación Científica y Tecnológica (SC-ICYT) de la Universidad de Cádiz (UCA).

7.1.7.2. Determinación de la cantidad de extracto impregnada

A la hora de determinar la cantidad de extracto impregnada en la matriz polimérica de PLA se recurrió al método gravimétrico. Esta técnica está fundamenta en el incremento másico que experimenta el polímero durante el proceso de impregnación, como resultado de la adsorción del CO₂ y del soluto, y su posterior pérdida de masa como resultado de la liberación del CO₂ adsorbido inicialmente. Durante el proceso de despresurización y los momentos inmediatamente posteriores, esta pérdida de masa provocada por la liberación del CO₂ superficial es más notable. La desorción del CO₂ interno se prolonga considerablemente en el tiempo.

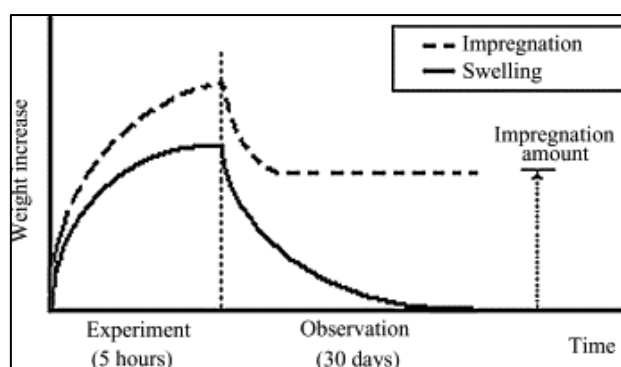


Figura 12. Representación del perfil másico de una muestra polimérica tras el proceso de impregnación (Üzer, Akman, & Hortaçsu, 2006).

Considerando el tiempo necesario para la desorción total del CO₂ adsorbido durante la impregnación, la masa de extracto impregnada en la matriz polimérica se puede determinar como la diferencia de masas entre cada una de las muestras impregnadas en un tiempo infinito (t) y las muestras de PLA antes del proceso de impregnación. Por tanto, para poder determinar la carga de soluto impregnada ha sido necesario realizar un seguimiento diario del perfil másico de las distintas muestras con ayuda de una balanza de precisión *Mettler Toledo AG135*. Conocida la masa de extracto impregnada podemos determinar el parámetro conocido como carga de impregnación según indica la ecuación [11].

$$\text{Carga de impregnación (\%)} = \frac{\text{Masa de extracto impregnada}}{\text{Masa PLA}_t} \quad [11]$$

- **Masa PLA_t** → Hace referencia a la masa de la muestra utilizada para determinar la cantidad de extracto impregnada en un determinado tiempo infinito, t.

A partir de los datos correspondientes a la masa de extracto impregnado de cada uno de los 4 fragmentos de PLA que forman parte de una misma tanda de impregnación, también es posible calcular el rendimiento del proceso de impregnación (ecuación [12]).

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Masa de extracto impregnada}_{\text{total}} \text{ (g)}}{\text{Masa de extracto en el reactor (g)}} \quad [12]$$

La masa de extracto en el reactor se calcula mediante la ecuación [13]:

$$\text{Masa de extracto en el reactor (g)} = V_{\text{extracto}} \text{ (mL)} \times [\text{ }]_{\text{extracto}} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) \times \frac{1 \text{ g}}{10^6 \mu\text{g}} \quad [13]$$

7.1.7.3. Determinación de la actividad antioxidante

Dado que la capacidad antioxidante de un producto está relacionada directamente con su concentración y su actividad biológica, en el presente trabajo se analizó la capacidad antioxidante de los polímeros impregnados como representativa de la carga bioactiva que éstos presentan. Nuevamente, para poder analizar la capacidad antioxidante del polímero impregnado, se recurrió al ensayo de DPPH, adaptado para el caso de la capacidad antioxidante de un sólido impregnado. Se seleccionaron muestras de PLA impregnado con cada uno de los extractos (por triplicado) y se pesaron antes de introducirlos en frascos ámbar con 8 mL de solución de DPPH a concentración $6 \cdot 10^{-5}$ M.

En esta ocasión, al ser necesaria la difusión de los compuestos antioxidantes a través de la matriz polimérica, el ensayo tuvo una duración de 24 h. Se midieron la absorbancia inicial y las absorbancias tras 1, 2 y 24 h de reacción a una longitud de onda de 515 nm (espectrofotómetro UVmini-1240 de *Shimadzu Scientific Instruments*). Conocidos los datos de las distintas medidas de absorbancia es posible determinar el porcentaje de inhibición de la matriz polimérica tras la impregnación mediante la ecuación [14].

$$\% \text{ Inhibición}_{\text{PLA}} = \frac{\text{Absorbancia}_{\text{inicial}} - \text{Absorbancia}_t}{\text{Absorbancia}_{\text{inicial}}} \times 100 \quad [14]$$

- **Absorbancia_{inicial}** → Absorbancia del DPPH a tiempo cero.
- **Absorbancia_t** → Absorbancia de la muestra a tiempo, t.

Dada la variabilidad existente entre los distintos fragmentos de PLA analizados, es necesario calcular el porcentaje de inhibición por cada 100 mg de polímero como se indica en la ecuación [15].

$$\frac{\% \text{ Inhibición}}{100 \text{ mg PLA}} = \frac{\% \text{ Inhibición}_{\text{PLA}}}{\text{Masa}_{\text{PLA impregnado}} (\text{mg})} \times 100 \quad [15]$$

- **Masa_{PLA impregnado}** → Masa de la muestra de PLA analizada en miligramos.

7.1.8. ENSAYOS DE VIABILIDAD

7.1.8.1. Análisis del efecto de los extractos puros

Para determinar de manera preliminar el efecto de los extractos sobre la proliferación celular, se realizó un cultivo con células endoteliales formadoras de colonias (ECFC_s). Para ello se incubaron estas células con distintas concentraciones de los extractos de mango, olivo y hollejo, como se indica a continuación (tabla 5).

Tabla 5. Concentraciones de los extractos usados en el ensayo de proliferación celular.

	Concentración (µg/mL o ppm)					
Mango H ₂ O	11,667	23,333	46,667	93,334	186,668	373,336
Mango EtOH	4,922	6,563	13,126	26,252	52,504	105,008
Olivo H ₂ O	46,667	70	140	280	560	1120
Olivo EtOH	46,667	70	140	280	560	1120
Hollejo H ₂ O	58,333	116,667	233,334	466,668	933,336	1866,672
Hollejo EtOH	11,667	23,333	46,667	93,334	186,668	373,336

En cada uno de los pocillos se añadieron 35.000 células (en una placa de 24 pocillos) que se incubaron en medio de cultivo EBM®-2 de Lonza suplementado con factores de crecimiento (VEGF, hFGF-B, hEGF y R3-IGF-1), 20% FBS, hidrocortisona, ácido ascórbico, heparina y antibióticos, añadiendo además el volumen correspondiente de extracto para alcanzar las concentraciones definidas en la tabla 5, siendo el volumen total de 500 µL ($V_{\text{extracto}} + V_{\text{suspensión celular}} + V_{\text{medio de cultivo}}$).

Para ello, se partió de un flask de 75 cm² (T75) conteniendo células ECFC confluentes, con suficiente cantidad de células para poder llevar a cabo los ensayos posteriores. Para recoger estas células y llevarlas y repartirlas en la placa de 24 pocillos (tratados con gelatina al 1%), se retiró el medio de cultivo contenido en el flask T75 con ayuda de una bomba de aspiración y se lavaron las células con PBS 1x para eliminar cualquier resto del mismo. A continuación, mediante incubación con tripsina (5-10 minutos) se disgregó la monocapa celular. Posteriormente se neutralizó la tripsina añadiendo medio de cultivo fresco y la suspensión resultante se centrifugó, obteniéndose un precipitado celular que se resuspendió en nuevo medio fresco.

Finalmente, mediante un contador automático de células (TC20®, Bio-Rad) se determinó la concentración de la suspensión de ECFC_s ($2,55 \times 10^6$ células/mL). Por tanto, el volumen de suspensión a añadir en cada uno de los pocillos fue de 13,72 µL (para añadir 35.000 células por pocillo). Una vez

se añadió el medio EBM®-2 suplementado, se completó con el volumen de extracto correspondiente hasta alcanzar los 500 µL totales. Las células se incubaron con los distintos extractos y concentraciones, en un incubador al 5% de CO₂, 37°C, y se realizó una observación de la evolución del cultivo a las 24 y las 48 horas, tomándose imágenes de campo claro usando el objetivo 4X, con un microscopio invertido (AE2000 Series, *Motic*).

7.1.8.2. Análisis de la proliferación sobre el polímero impregnado

A diferencia del análisis de los extractos puros, en esta ocasión únicamente se realizaron los cultivos celulares con fragmentos de PLA impregnados con los extractos etanólicos.

Para ello, los fragmentos de PLA impregnados se introdujeron en cada uno de los pocillos de las placas de 24 pocillos. A continuación, se añadieron 500 µL de medio de cultivo EBM®-2 a cada pocillo para garantizar así que el polímero quedase cubierto.

Por otro lado, sobre estos fragmentos de PLA se depositaron células ECFCs a una concentración inicial de $1,33 \times 10^6$ células/mL, analizando inicialmente 2 cantidades distintas, concretamente 30.000 y 60.000 células por pocillo. La determinación de la concentración de ambas suspensiones celulares se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente (ver 7.1.8.1). Según esto, los volúmenes de suspensión celular a añadir fueron de 22,56 y 45,11 µL respectivamente.

La evolución de los cultivos se evaluó mediante el uso de un microscopio invertido (IX81, *Olympus*) de manera análoga a la citada con anterioridad (ver 7.1.8.1).

7.1.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Todas las pruebas se realizaron por triplicado y se obtuvo una media de los resultados procedentes de cada una de las réplicas. Con el objetivo de determinar el error experimental de los resultados se analizó también la desviación estándar de los mismos. Todos estos análisis se realizaron mediante el software “Microsoft Excel”. Adicionalmente se realizó un test estadístico (t-student) para evaluar si las diferencias observadas entre los extractos, en función del medio acuoso o alcohólico, fueron significativas. De este modo, todas aquellas diferencias con p-value <0.05 se consideraron como significativas (intervalo de confianza del 95%).

7.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.2.1. EXTRACCIÓN CON LÍQUIDOS PRESURIZADOS

El método seleccionado para la obtención de las sustancias bioactivas presente en las hojas de mango y olivo, así como en el hollejo de uva tinta fue la PLE. Esta elección se realizó en base a las ventajas que esta técnica ofrece frente a las técnicas convencionales de extracción, descritas anteriormente (ver 5.3). Además en comparación con otras técnicas de extracción a alta presión como puede ser la extracción supercrítica, estudios previos demuestran como la PLE se traduce en un mayor rendimiento del proceso extractivo de los compuestos de interés y una mayor actividad antioxidante de los extractos finales (M^a Teresa Fernández-Ponce et al., 2015, 2016).

Dado que las condiciones de temperatura y de presión de trabajo, 80°C y 200 bar respectivamente, se fijaron en base a los resultados de análisis previos (M^a Teresa Fernández-Ponce et al., 2015, 2016); las variables sobre las que se centra el estudio son la materia prima y los disolventes (agua y etanol) utilizados.

7.2.1.1. Rendimiento del proceso extractivo

El rendimiento de la extracción constituye un parámetro muy útil ya que es indicativo de la idoneidad de los disolventes en lo que respecta a la extracción de los compuestos de interés. En la figura 13 se representa el rendimiento de extracción en porcentaje para las distintas materias primas analizadas y disolventes utilizados. En lo que respecta a la materia prima, independientemente del disolvente, los rendimientos más altos se corresponden con las hojas de olivo mientras que aquellos más bajos son relativos al hollejo de uva tinta. En cuanto al disolvente, el etanol demostró gran eficacia con las hojas de olivo mientras que con agua como disolvente, el rendimiento más alto se obtuvo a partir de las hojas de mango. En el caso del hollejo de uva tinta, no se observaron diferencias significativas con los dos disolventes. Sin embargo, si se observaron diferencias significativas (en función de los disolventes) en el caso de los extractos de hojas de mango ($p\text{-value} = 0,0005$) y de hojas de olivo ($p\text{-value} = 0,008$).

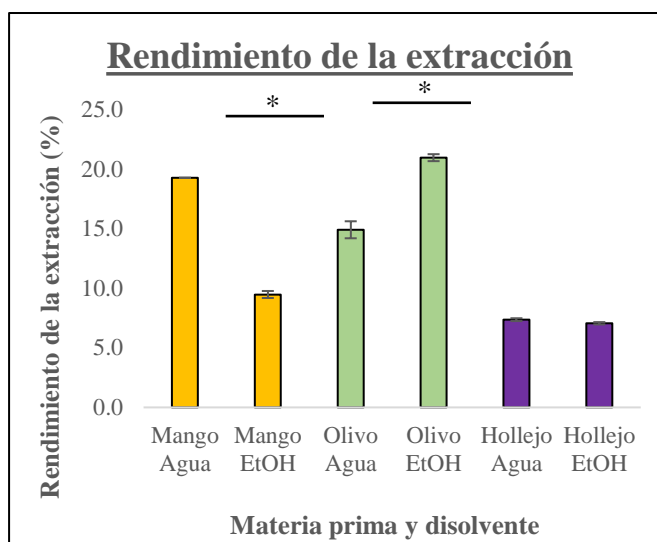


Figura 13. Diagrama de bloques del rendimiento de la extracción en función de la materia prima y el disolvente. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre las muestras ($p\text{-value} < 0.05$).

Los rendimientos correspondientes a las extracciones a partir de hojas de mango fueron del 19,25% y del 9,47% para los extractos acuoso y etanólico respectivamente. A pesar de que siguen la misma tendencia que estudios previos donde el rendimiento es mayor al utilizar agua como disolvente, los valores obtenidos fueron considerablemente más bajos si los comparamos con la bibliografía. En un experimento con las mismas condiciones de presión y temperatura y que utilizaba la misma variedad de mango que en nuestro caso (*Mangifera indica* L. cv. Kent), los rendimientos para la extracción con agua y etanol fueron del 37% y del 30% aproximadamente (M^a Teresa Fernández-Ponce et al., 2015). Estas diferencias pueden ser debidas a variaciones en tiempo de extracción, al hecho de que en nuestro caso trabajamos en continuo o a variaciones en la composición de la materia prima propiciadas por el momento de la recolección.

En el caso de las hojas de olivo, los rendimientos fueron del 14,90% para el extracto con agua y del 20,95% para el extracto con etanol. Herrero *et al.* (2011), a partir de hojas de olivo suministradas por nuestro mismo proveedor (Olivarera San José de Lora de Estepa S.Coop. And.), obtuvo unos resultados ligeramente superiores con un rendimiento del 21,3% para los extractos con agua y del 23% en caso de utilizar etanol como disolvente. Dichas diferencias pueden estar justificadas porque las condiciones de operación ($T = 100^{\circ}\text{C}$, $P = 103,42 \text{ bar}$) son distintas a las utilizadas en nuestro caso ($T = 80^{\circ}\text{C}$, $P = 200 \text{ bar}$). La menor presión durante el proceso de extracción, se ve compensada por el incremento de la temperatura que en el propio estudio ha demostrado estar asociado a un aumento del rendimiento del proceso (Herrero et al., 2011).

Al igual que sucede con los casos anteriores, los rendimientos obtenidos en la extracción de hollejo de uva tinta con agua y etanol, 7,36% y 7,06% respectivamente, fueron inferiores a los encontrados en la bibliografía. En un estudio enfocado en la optimización de la extracción de compuestos antioxidantes procedentes del orujo de distintas variedades de uva tinta, entre ellas Petit Verdot, se obtuvieron rendimientos próximos al 25% al utilizar agua subcrítica y cercanos al 15% en caso de recurrir al etanol como disolventes (Otero-Pareja, Casas, Fernández-Ponce, Mantell, & De La Ossa, 2015). Del mismo modo que hemos comentado anteriormente, la temperatura establecida durante el proceso de extracción ($T = 100^{\circ}\text{C}$) es superior a la utilizada en nuestro estudio ($T = 80^{\circ}\text{C}$), lo que explica este mayor rendimiento.

7.2.1.2. Contenido total de polifenoles

A continuación, se recoge el TPC de los distintos extractos dependiendo del tipo de materia prima y disolvente utilizados en el proceso de extracción (ver figura 14). Las hojas de mango presentaron el mayor contenido en polifenoles frente al hollejo de uva tinta y las hojas de olivo, que ocupan el último lugar. Por otro lado, a pesar de que esta condición no se cumple con las hojas de olivo, de acuerdo con

los resultados obtenidos el etanol supondría una mejor alternativa que el agua para la extracción de compuestos polifenólicos. En el caso de los extractos de hojas de mango, las diferencias fueron significativas ($p\text{-value} = 0,0006$).

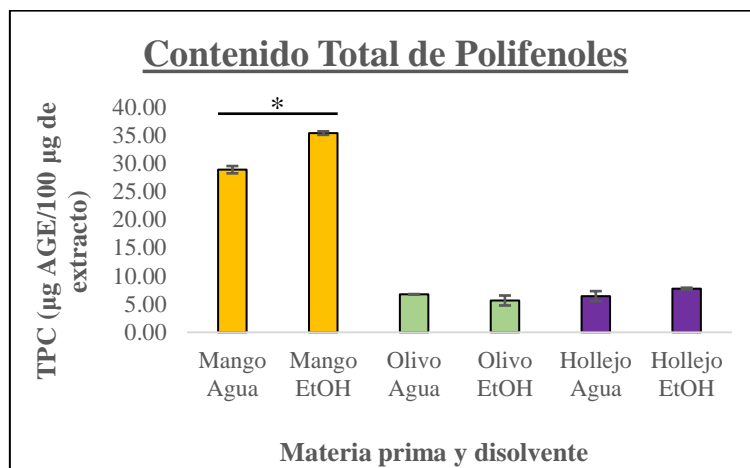


Figura 14. Diagrama de bloques del TPC en función de la materia prima y el disolvente. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre las muestras ($p\text{-value} < 0.05$).

El TPC correspondiente a los extractos de hojas de mango con agua y etanol es de 28,86 y 35,36 µg AGE/ 100 µg extracto respectivamente. En un estudio previo realizado por M^a Teresa Fernández-Ponce *et al.* (2015), con unas condiciones de trabajo (presión y temperatura) idénticas a las utilizadas en nuestro caso, el TPC del extracto acuoso (43,33 µg AGE/ 100 µg extracto) y del etanólico (55,5 µg AGE/ 100 µg extracto) era considerablemente más elevado. No obstante, estas diferencias que podrían ser consecuencia de variaciones en la composición de la materia prima inherentes a su producción y recolección o al pretratamiento propio al que se ve sometida, no ocultan la mayor selectividad del EtOH puro frente al agua a la hora de extraer compuestos fenólicos (B. B. Li *et al.*, 2006; Stoica *et al.*, 2013), independientemente de que el rendimiento global de extracción sea inferior.

El contenido total de polifenoles de los extractos de hojas de olivo, siendo de 6,75 µg AGE/ 100 µg extracto para el acuoso y de 5,65 µg AGE/ 100 µg extracto para el de etanol, se encuentra próximo a los valores obtenidos por Herrero *et al.* (2011). Se realizaron extracciones a 103,42 bar y en un rango de temperaturas de 50-200°C con unos resultados de TPC que oscilaban entre 2,83-5,87 µg AGE/ 100 µg extracto para el agua subcrítica y entre 2,62-4,58 µg AGE/ 100 µg extracto en el caso del etanol.

En lo que respecta al TPC de los extractos de hollejo de uva tinta, no hubo una gran diferencia entre el uso de agua ($6,416 \pm 0,892$ µg AGE/ 100 µg extracto) y etanol ($7,748 \pm 0,165$ µg AGE/ 100 µg extracto). Del mismo modo que ocurre con el rendimiento global del proceso, los valores de polifenoles totales resultaron inferiores a los descritos en la bibliografía para un proceso de PLE a partir de orujo de uva tinta (variedad Petit Verdot) utilizando agua ($33,46 \pm 0,91$ µg AGE/ 100 µg extracto) y etanol ($20,49 \pm 0,94$ µg AGE/ 100 µg extracto) puros como disolventes (Otero-Pareja *et al.*, 2015). El mayor poder

extractivo puede ser debido a la mayor temperatura de trabajo ($T = 100^{\circ}\text{C}$) del estudio descrito, cuyo efecto es predominante sobre el de la presión, favoreciendo el proceso extractivo.

7.2.1.3. Contenido total de antocianos

Los extractos de hollejo de uva tinta fueron analizados para determinar el contenido total de antocianos (TAC) de los mismos. En la tabla 6 queda recogido el TAC junto con su desviación estándar en función del disolvente empleado en la extracción. Es posible apreciar como el contenido del extracto con etanol era alrededor de unas 30 veces superior al del extracto acuoso existiendo diferencias significativas entre ambos disolventes ($p\text{-value} = 2,5 \cdot 10^{-5}$).

Tabla 6. *Contenido total de antocianos en los extractos de hollejo de uva tinta.*

Materia prima	Disolvente	Contenido en antocianos totales (mg AM/100 g extracto)
Hollejo de uva tinta	Agua	$0,594 \pm 0,39$
	EtOH	$17,122 \pm 0,44$

Atendiendo a la bibliografía, los resultados obtenidos en cuanto a la concentración de antocianos para los extractos acuoso ($0,594 \text{ mg AM/100 g extracto}$) y etanólico ($17,122 \text{ mg AM/100 g extracto}$) son sustancialmente menores a los de otros ensayos previos. En lo referente al extracto con etanol para una temperatura y presión de trabajo de 80°C y 100 bar, la concentración de antocianina monomérica obtenida fue de $4,52 \text{ mg malvidina-3-glucósido (Mv-3-glc)/g extracto}$. Para el extracto acuoso, la presión de trabajo era la misma pero la temperatura disminuyó hasta los 40°C siendo la concentración de $7,42 \text{ mg Mv-3-glc/g extracto}$ (Pereira, Tarone, Cazarin, Barbero, & Martínez, 2019).

Algunas de las causas que podrían justificar esta variabilidad entre ambos resultados son: la distinta presión de trabajo; el hecho de que en el estudio encontrado en la bibliografía se presenten los resultados en términos de una antocianina distinta a la que hemos utilizado en nuestro caso como referencia, la cianidina-3-glucósido, así como la variabilidad propia de la variedad de uva tinta utilizada en el estudio citado (*Vitis vinifera* cv. Syrah) y el año de su cosecha. Si nos centramos en el extracto acuoso, al acidificar el medio hasta pH 2.0 también aumenta el rendimiento de la extracción debido a la hidrólisis ácida de la pared celular y a la mayor estabilidad de este tipo de compuestos en un rango de pH de 1.0 a 3.0. (Türker & Erdog˘du, 2006).

7.2.1.4. Actividad antioxidante

En la figura 15 se detalla la capacidad antioxidante de cada uno de los extractos dependiendo de la materia prima y el disolvente utilizado en términos de índice de actividad antioxidante (AAI). Las hojas de mango constituyen la materia prima con una mayor capacidad antioxidante como reflejan los valores de AAI. Si nos centramos en los efectos del disolvente, también se aprecia, especialmente en el caso de los extractos de mango ($p\text{-value} = 0,0035$), como el etanol es responsable de un incremento del

AAI existiendo diferencias significativas incluso entre los extractos de hollejo ($p\text{-value} = 0,009$). Estos resultados concuerdan con la mayor selectividad del etanol a la hora de extraer compuestos fenólicos (B. B. Li et al., 2006; Stoica et al., 2013; Yang & Zhang, 2008) y la relación existente entre la capacidad antioxidante y el TPC (Pereira et al., 2019).

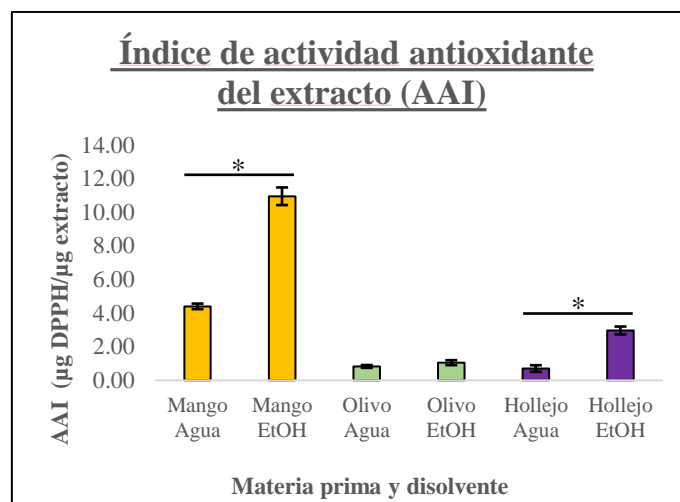


Figura 15. Diagrama de bloques del índice de actividad antioxidante (AAI) de los extractos en función de la materia prima y el disolvente. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre las muestras ($p\text{-value} < 0.05$).

El valor de AAI correspondiente al extracto acuoso de hojas de mango resultó de $4,400 \pm 0,165$ µg DPPH/ µg extracto mientras que el del extracto etanólico fue $10,952 \pm 0,525$ µg DPPH/ µg extracto. Para las mismas condiciones de presión y de temperatura, estudios previos en los que se utilizó la misma variedad de mango como materia prima (*Mangifera indica* L. cv. Kent) obtuvieron valores de AAI de aproximadamente 4,579 µg DPPH/ µg extracto para los extractos con cada tipo de disolvente (M^a Teresa Fernández-Ponce et al., 2015). La notable diferencia que existe en el caso del extracto con EtOH puede ser debida a la variabilidad propia de la composición de la materia prima entre los distintos lotes.

Centrándonos en las hojas de olivo, los índices de actividad antioxidante para los extractos acuoso y etanólico fueron $0,827 \pm 0,084$ y $1,051 \pm 0,148$ µg DPPH/ µg extracto respectivamente. Cejudo Bastante et al. (2017), con anterioridad analizó la capacidad antioxidante de extractos de hojas de olivo obteniendo resultados similares. Los extractos demostraron ser un potente antioxidante según la clasificación de Scherer y Godoy (Scherer & Godoy, 2009), con un valor de AAI de $1,06 \pm 0,1$ µg DPPH/ µg extracto. Es destacable que el mayor AAI del extracto etanólico, no se corresponda con su menor TPC respecto al extracto acuoso. El motivo de este fenómeno puede ser la mayor selectividad del etanol a la hora de extraer compuestos como la oleuropeína y sus derivados, con gran capacidad antioxidante (Goldsmith et al., 2018).

Por último, el extracto de hollejo de uva tinta con agua tuvo un EC_{50} de $34,192 \pm 9,518$ ppm y el extracto con etanol de $7,816 \pm 0,620$ ppm. En un estudio previo, mediante PLE se obtuvieron extractos acuosos

y etanólicos a partir de la variedad de uva tinta cv. Petit Verdot cuyos EC_{50} resultaron ser 9,6 y 7,6 ppm respectivamente (Otero-Pareja et al., 2015). No se observaron diferencias notables en lo referente a la solución alcohólica pero sí en la actividad de los extractos acuosos, siendo el obtenido en nuestro caso considerablemente menos potente. A diferencia de lo observado con las hojas de olivo, la mayor actividad antioxidante coincide con el mayor TPC y TAC del extracto de hollejo con etanol.

7.2.2. IMPREGNACIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Las impregnaciones se realizaron con los extractos etanólicos de hojas de mango, hojas de olivo y hollejo de uva tinta obtenidos mediante PLE, ya que considerando los resultados tras la caracterización de su contenido en polifenoles totales y de su actividad antioxidante, demostraron mayor eficacia que sus homólogos acuosos.

En lo que respecta a las condiciones del proceso de impregnación, se mantuvieron constantes para cada uno de los extractos ($T = 55^{\circ}\text{C}$, $P = 250$ bar, $v_{\text{desp}} = 120$ bar/min, 5% extracto/EtOH y $t = 3$ h), con objeto de evaluar el efecto de cada uno de los extractos sobre la actividad antioxidante y la carga de impregnación de los polímeros resultantes.

7.2.2.1. Análisis de la matriz polimérica mediante microscopía electrónica

Las imágenes de la matriz polimérica se obtuvieron por microscopía electrónica de barrido (SEM). En la figura 16 es posible observar la estructura de la superficie de uno de los fragmentos de PLA sin impregnar; es decir, directamente tras el proceso de impresión 3D. Aunque pueden apreciarse pequeñas rugosidades que pueden ser propias del material o provocadas por el proceso de fabricación aditiva, la superficie de la matriz es prácticamente lisa.

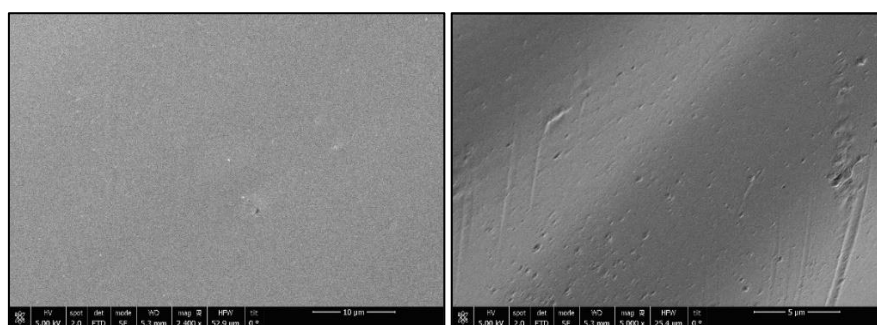


Figura 16. Imágenes de SEM del PLA sin impregnar a 2400 aumentos (izquierda) y 5000 aumentos (derecha).

En la figura 17 se presentan imágenes de fragmentos de PLA impregnados con cada uno de los extractos mencionados y bajo las condiciones descritas anteriormente. Debido a la difusión del CO_2 a través de la matriz polimérica se aprecian diferencias notables entre sus superficies, con mayor rugosidad y porosidad, y la del control anterior (figura 16). A pesar de que las condiciones de operación eran idénticas, pueden observarse algunas diferencias entre cada uno de los extractos ocasionadas por las formas irregulares de las partículas de cada uno de ellos. No obstante, en ninguna de las muestras estas

partículas pudieron visualizarse con claridad, bien porque debido al mayor volumen disponible como consecuencia del hinchamiento del polímero se encuentran más dispersas en el interior de la matriz, o bien porque se tendrían que usar aumentos de mayor tamaño.

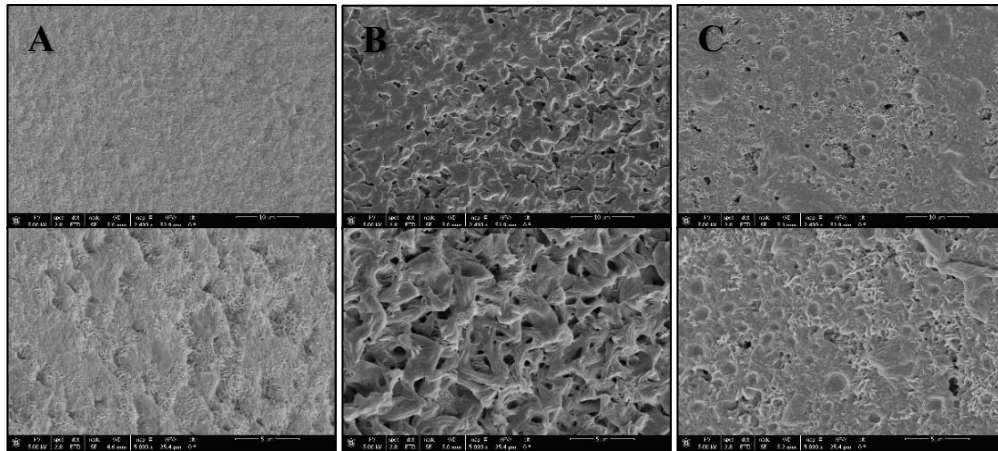


Figura 17. Imágenes de SEM del PLA impregnado con extracto etanólico de mango (A), olivo (B) y hollejo (C) a 2400 aumentos (arriba) y 5000 aumentos (abajo).

7.2.2.2. Rendimiento del proceso de impregnación

En la figura 18 se aprecia la evolución del perfil másico de los fragmentos de PLA impregnados con cada uno de los extractos. Podemos observar cómo se cumple la misma tendencia descrita anteriormente en el apartado 7.1.7.2. En las primeras 24 h tras la impregnación la pérdida de masa fue significativa; sin embargo, el proceso de desorción del CO₂ es cada vez más lento y se prolonga en el tiempo. Pasado un determinado tiempo (t), todo el CO₂ es liberado de manera que la masa de los fragmentos se estabiliza pudiendo determinar la masa real impregnada y el parámetro conocido como carga de impregnación (masa extracto impregnada/masa PLA).

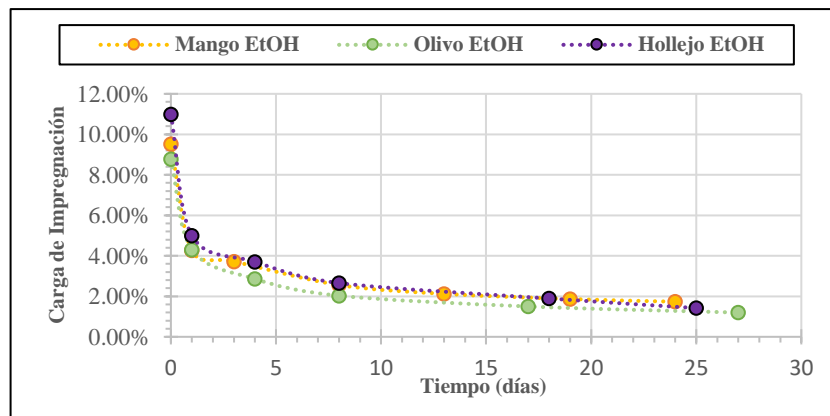


Figura 18. Perfil másico de las muestras de polímero impregnadas en términos de carga de impregnación.

Los valores de carga de impregnación obtenidos han sido del 1,74%, 1,20% y 1,42% para los extractos de hojas de mango, hojas de olivo y hollejo de uva tinta respectivamente. A pesar de trabajar con

diferentes extractos, los resultados obtenidos han sido bastante similares para todos ellos, hecho propiciado en gran medida por las mismas condiciones de extracción y posteriores de impregnación aplicadas. En un estudio previo realizado por el grupo de investigación destinado a la impregnación de PLA con ketoprofeno, bajo las mismas condiciones de presión ($P = 250$ bar) y temperatura ($T = 55^{\circ}\text{C}$) se obtuvieron también valores de carga de impregnación de entre 1% y 2% (Verano Naranjo, 2020).

En cuanto al rendimiento global del proceso de impregnación, los resultados obtenidos pueden verse en la tabla 7. El extracto de mango con etanol es el que ofreció los mejores resultados ($7,85 \pm 0,91\%$), seguido por el de olivo ($3,90 \pm 0,35\%$) y el de hollejo ($3,51 \pm 1,05\%$). Comparando con la literatura existen estudios centrados en la impregnación de compuestos polifenólicos procedentes de extracto de mango (variedad Kent) en matrices textiles de poliéster donde se obtuvieron rendimientos que van desde el 24,5% (55°C y 500 bar) al 55,8% (55°C y 400 bar) (Sanchez-Sanchez et al., 2017). Estos altos porcentajes pueden ser debidos al aumento de la solubilidad de los compuestos antioxidantes y del hinchamiento de la matriz como consecuencia del aumento de presión, facilitando el transporte de una mayor cantidad de moléculas hacia el interior del polímero (Mathilde Champeau et al., 2015). Respecto a los extractos de olivo y hollejo, la bibliografía disponible es bastante escasa por lo que no ha sido posible comparar nuestros resultados con los de otros ensayos previos.

Tabla 7. Rendimiento global del proceso de impregnación.

Extracto	Rendimiento del proceso de impregnación (%)
Mango EtOH	$7,85 \pm 0,91$
Olivo EtOH	$3,90 \pm 0,35$
Hollejo EtOH	$3,51 \pm 1,05$

7.2.2.3. Actividad antioxidante del polímero impregnado

Teniendo en cuenta que el principal objetivo de este trabajo es estudiar la proliferación celular sobre polímeros impregnados, y a pesar de que ya se había demostrado la actividad antioxidante de los extractos, resultaba necesario comprobar si el PLA conserva aún dicha actividad tras el proceso de impregnación con fluidos supercríticos. A continuación (ver figura 19), se muestran los valores de la capacidad antioxidante de la matriz polimérica con cada uno de los extractos en términos de su porcentaje de inhibición / 100 mg de PLA. Si atendemos a los resultados de los extractos puros (apartado 7.2.1.4) podemos observar como el extracto de mango sigue presentando la mayor actividad antioxidante ($37,85\% \pm 3,925$), seguido por el extracto de hollejo de uva tinta ($33,64\% \pm 9,055$) y por el de hojas de olivo ($17,03\% \pm 0,683$), que es el que cuenta con menor actividad antioxidante.

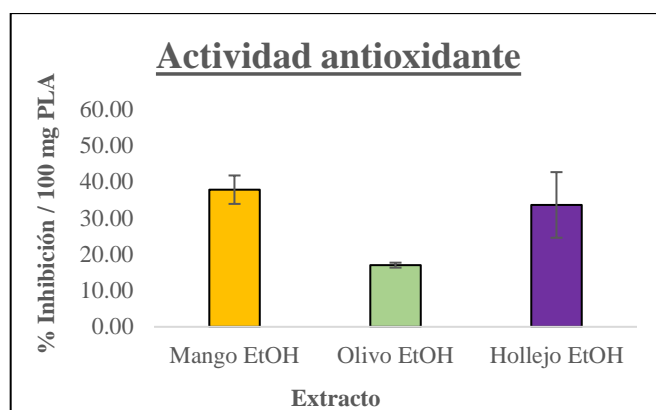


Figura 19. Diagrama de bloques de la actividad antioxidante del PLA impregnado con cada uno de los extractos.

Como hemos comentado anteriormente, resulta difícil encontrar estudios previos donde se caractericen distintos polímeros impregnados con alguno de estos extractos. Si nos centramos en los resultados para las impregnaciones con extracto etanólico de hojas de olivo (17,03 %I / 100 mg PLA), estos son inferiores a los obtenidos en un estudio realizado por Cejudo Bastante y colaboradores (2017). Se impregnaron films de tereftalato de polietileno (PET) y polipropileno (PP) a una temperatura de 35°C, una V_{desp} de 100 bar/min y en un rango de presiones de 100 a 400 bar con unos %I / 100 mg que oscilaban entre el 60% y el 112,71% (Cejudo Bastante et al., 2017).

En el estudio anterior se observa la misma tendencia que en otro destinado a la impregnación de poliéster con extracto de hojas de mango (Sanchez-Sanchez et al., 2017), donde un incremento de la presión se traduce en una mayor actividad antioxidante de los productos de impregnación. Otro fenómeno relevante de este último estudio es que comparando los valores AAI, la capacidad antioxidante del polímero impregnado era superior a la de los extractos crudos. Por tanto, es posible que exista un efecto sinérgico de los compuestos impregnados potenciando así la actividad antioxidante del polímero impregnado. Tampoco es descartable la opción que otros compuestos que aún no hayan sido identificados afecten también a la actividad antioxidante (Sanchez-Sanchez et al., 2017).

7.2.3. ENSAYOS DE VIABILIDAD

7.2.3.1. Efecto de los extractos puros en el proceso de endotelización

Para determinar la influencia de los extractos obtenidos sobre el cultivo de células endoteliales ECFCs, se realizó un ensayo preliminar con distintas concentraciones de los extractos de hojas de mango, hojas de olivo y hollejo de uva tinta en función de los resultados de actividad antioxidante descritos previamente. Los resultados reflejan como en el rango inicial de concentraciones fijadas (13,126–560 ppm), los extractos parecían no influir en el desarrollo y la viabilidad de las ECFCs independientemente del disolvente utilizado (figuras 20 y 21)

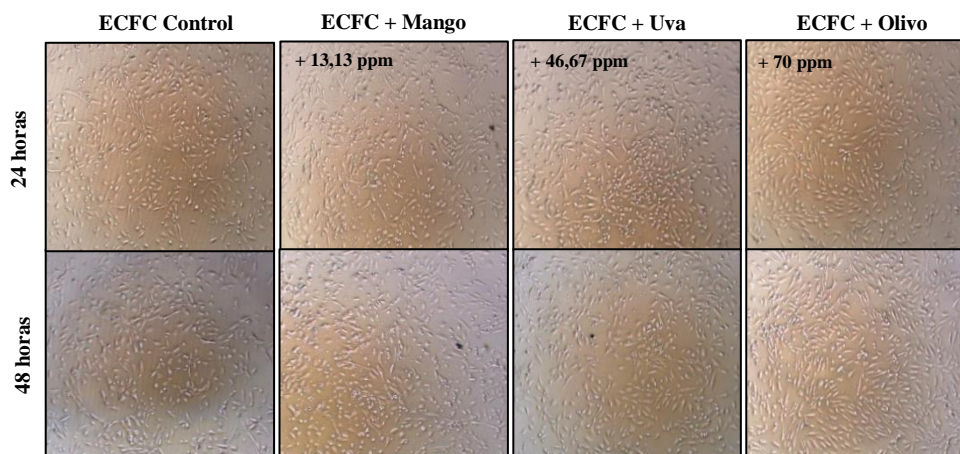


Figura 20. Cultivos de ECFCs en presencia de los extractos etanólicos tras 24 y 48 horas.

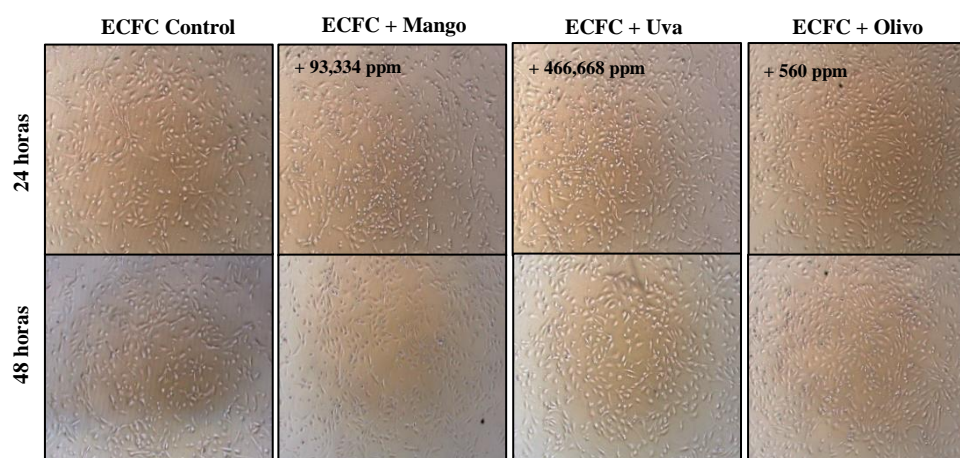


Figura 21. Cultivos de ECFCs en presencia de los extractos acuosos tras 24 y 48 horas.

A medida que se incrementaron las concentraciones de los extractos sí se observó una reducción en el número total de células y la viabilidad de las mismas sin que existiesen diferencias destacables a las 24 y las 48 horas (figura 22). Este fenómeno concuerda con resultados de estudios previos en los que se demostró la capacidad antiproliferativa de este tipo de extractos naturales sobre diversos tipos celulares incluyendo células endoteliales (S. S. Balea et al., 2020; Goulas et al., 2009; Núñez Selles, Daglia, & Rastrelli, 2016). No obstante, en el caso de los extractos con EtOH, las concentraciones a las que comenzó a observarse este fenómeno eran menores que con los extractos acuosos y esto podría deberse a dos razones. Por un lado, es probable que la mayor selectividad extractiva del EtOH y por tanto el mayor TPC, compuestos responsables de la capacidad antiproliferativa y antioxidante entre otras, fuese responsable de este hecho. Por otro lado, tampoco es descartable la opción de que un aumento de la concentración del extracto y por ende del volumen de EtOH, tóxico para las células, adicionado al cultivo hubiese provocado la muerte de las mismas.

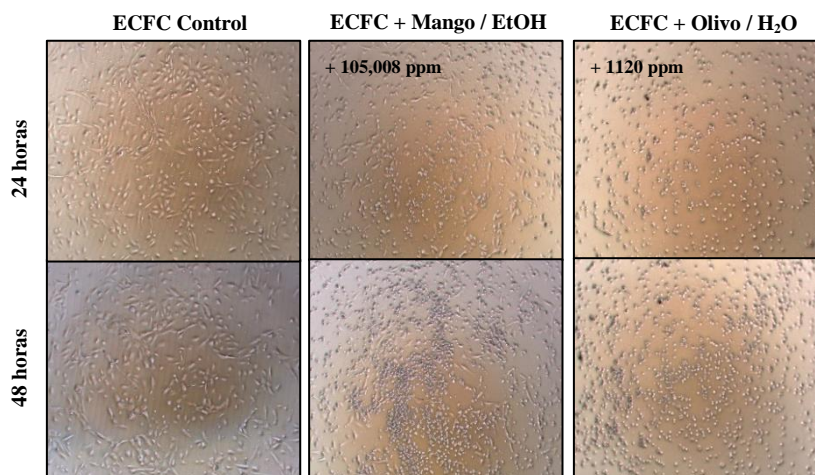


Figura 22. Evolución de las ECFCs en presencia de concentraciones elevadas de extracto a las 24 y 48 horas.

A pesar de la tendencia general descrita previamente, en el caso de las células tratadas con extracto de hojas de mango (figura 23 B) y de hollejo de uva tinta (figura 23 C) obtenidos con agua subcrítica, se pudo apreciar cómo las ECFCs se agruparon tendiendo a formar una especie de estructura reticular similar a la que aparece en la figura 23 A, característica de los procesos angiogénicos y que se encuentran relacionados con la formación de nuevos vasos sanguíneos, entre otros.

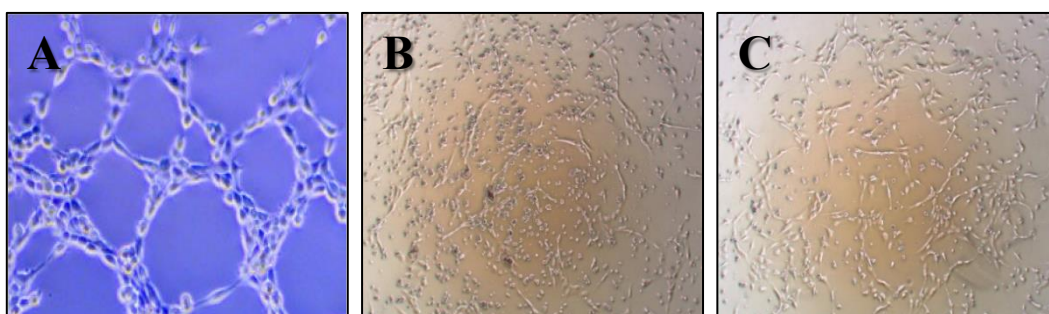


Figura 23. Distribución “angiogénica” de ECFCs tras 48 horas. A) Ejemplo de un ensayo de angiogénesis (DeCicco-Skinner et al., 2019). B) Extracto de hojas de mango con agua (373,336 ppm). C) Extracto de hollejo de uva tinta con agua (1866,672 ppm).

7.2.3.2. Efecto del PLA impregnado en el proceso de endotelización

El objetivo final del presente TFG era analizar la proliferación celular sobre la matriz polimérica impregnada con los extractos naturales. Una de las primeras incógnitas era la afinidad de las ECFCs por el soporte utilizado, PLA en nuestro caso. Para ello utilizamos un control constituido por una muestra de PLA sin impregnar. Los resultados obtenidos (figura 24) evidencian que a pesar de que algunas de las células en cultivo fueron capaces de adherirse a la muestra de PLA, la ausencia de elementos superficiales dificultó en gran medida este proceso. Las características de la interfase entre las células y el material son cruciales para los procesos de adhesión, proliferación y migración celular (Zhao et al.,

2016), por lo que en futuros ensayos será necesario optimizar las propiedades de la matriz de PLA para facilitar la proliferación y el desarrollo de los cultivos.

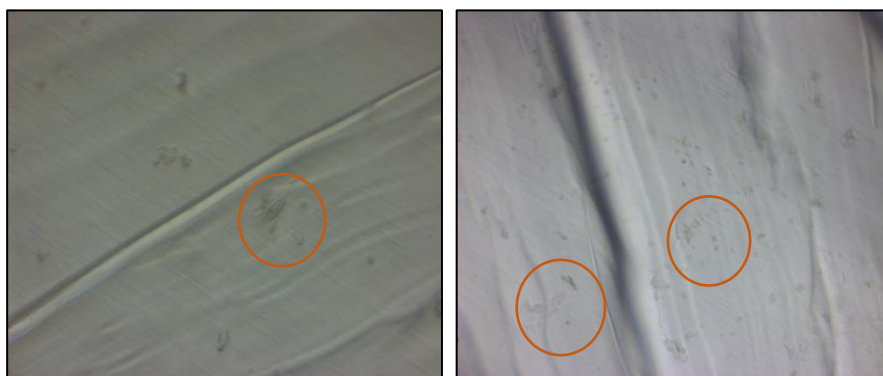


Figura 24. Evolución de las ECFCs sobre el PLA sin impregnar tras 48 horas.

En cuanto a las muestras de PLA impregnadas con los extractos naturales, a diferencia del control, no pudieron obtenerse imágenes concluyentes. Tras el proceso de impregnación las muestras de PLA pierden en gran medida el carácter translúcido, necesario para una observación clara de la progresión del cultivo. Esta modificación del PLA dificulta la toma de imágenes en el microscopio utilizado en este ensayo. Esto podría deberse principalmente a la elevada concentración de los extractos impregnados (20250 ppm) dando lugar a un producto con propiedades ópticas distintas a las del polímero inicial, dificultando la visualización de las células en el microscopio invertido de contraste de fases.

A pesar de la dificultad de utilizar el microscopio invertido de contraste en este ensayo y por tanto, la ausencia de imágenes, durante el análisis de microscopía fue posible apreciar que en la superficie del polímero no se detectaron células adheridas. La elevada cantidad de extracto bioactivo en el PLA también podría ser responsable de este fenómeno al obtenerse un polímero impregnado con un potencial bioactivo especialmente elevado. Esta alta actividad genera una inhibición importante sobre las ECFCs que unida a la baja afinidad inicial por el PLA, podrían ser las responsables de la baja proliferación celular detectada. No obstante, se requieren nuevos ensayos para poder corroborar estas observaciones preliminares y determinar de manera clara la influencia de la bioactividad del polímero sobre el desarrollo celular.

En el caso de que los nuevos resultados refrendasen las observaciones de este estudio, y por tanto la capacidad de la matriz impregnada de inhibir o retrasar en cierta medida la proliferación celular, podría confirmarse la potencial viabilidad del uso de este tipo de polímeros impregnados con extractos naturales para el desarrollo de ABs. Sin embargo, aún habría que encontrar un diseño óptimo que inhibiese de manera específica la proliferación de las células musculares lisas, responsables de la formación de la neoíntima o del proceso de RIS, pero no tuviese un efecto perjudicial sobre el desarrollo de las ECFCs permitiendo la regeneración controlada de un endotelio funcional.

8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos tras la caracterización de los extractos de hojas de mango, hojas de olivo y hollejo de uva tinta, ponen de manifiesto la eficacia de la técnica PLE ($P = 200$ bar y $T = 80^{\circ}\text{C}$) para la recuperación de compuestos de interés con actividad antioxidante. Aunque no quedase reflejado en el rendimiento global del proceso, el uso de etanol como disolvente en lugar de agua pura se tradujo en mayores valores de TPC, TAC y AAI poniendo de manifiesto su mayor selectividad a la hora de extraer compuestos polifenólicos y la relación de estos con la capacidad antioxidante de los extractos. Entre las distintas materias primas utilizadas, las hojas de mango presentaron la mayor actividad antioxidante con un valor de $10,952 \mu\text{g DPPH} / \mu\text{g extracto}$, seguidas por el hollejo de uva tinta y las hojas de olivo.

Los extractos etanólicos, dada su mayor capacidad antioxidante, fueron los elegidos para impregnar las muestras de PLA con CO_2SC a 250 bar de presión y a 55°C de temperatura. Independientemente del extracto utilizado, la carga de impregnación se mantuvo constante, con valores entre 1% y 2%, lo que puede deberse en gran medida a que las condiciones de operación se mantuvieron constantes.

Las matrices poliméricas impregnadas mantuvieron la capacidad antioxidante y la tendencia propia de los extractos puros, siendo aquellas impregnadas con extracto de mango las que contaron con mayor actividad con un porcentaje de inhibición del 37,85 % por cada 100 mg PLA.

En lo referente al efecto de los extractos sobre el crecimiento celular, a bajas concentraciones, los extractos de hojas de mango, hojas de olivo y hollejo de uva tinta no mostraron ningún efecto significativo sobre las ECFCs. Sin embargo, a concentraciones más elevadas se observó un descenso en el número total de células y en la viabilidad de las mismas. Este fenómeno fue especialmente significativo con los extractos etanólicos, dado que los efectos tóxicos empezaron a observarse a concentraciones más bajas, lo que pudo deberse a su mayor potencial bioactivo o la toxicidad del propio EtOH. No obstante, los extractos acuosos de hojas de mango y de hollejo de uva tinta a pesar de encontrarse a concentraciones elevadas (373,336 y 1866,672 ppm respectivamente) demostraron cierto potencial proangiogénico evidenciado por la formación de una estructura reticular por parte de las células endoteliales.

Dado el carácter preliminar de los ensayos celulares sobre las matrices de PLA impregnadas, no se pudieron obtener conclusiones relevantes en este caso. El estudio con microscopía invertida de contraste de fase no permite discernir sobre la capacidad proliferativa del polímero generado, por lo que para poder proseguir con el estudio será necesario modificar distintos aspectos para optimizar estos ensayos, favoreciendo el correcto desarrollo de los cultivos sobre las superficies de interés y obteniendo así resultados más fiables que permitan llegar a algún tipo de conclusión.

9. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Como ya hemos comentado con anterioridad, el presente trabajo de investigación se encuentra enmarcado dentro de un proyecto concedido por la Junta de Andalucía cuyo objetivo final es el desarrollo de stents poliméricos, bio-reabsorbibles y farmacoactivos mediante fabricación aditiva e impregnación con fluidos supercríticos. En primera instancia, los resultados obtenidos tras impregnar las matrices de PLA con extractos naturales de hojas de mango, hojas de olivo y hollejo de uva tinta han sido prometedores, por lo que a continuación se exponen una serie de recomendaciones que podrían ser de utilidad a la hora de proseguir con la investigación.

Teniendo en cuenta el carácter preliminar de los ensayos celulares, quizás sea el apartado del presente estudio en el que se puedan mejorar o pulir más aspectos a corto plazo. En lo referente a los ensayos con extractos puros, partiendo de los resultados ya obtenidos con cada uno de ellos, sería recomendable llevar a cabo nuevas pruebas con un abanico de concentraciones más reducido que permita determinar de manera más precisa el valor límite a partir del cual se pueda apreciar la bioactividad de los compuestos naturales de manera notable. También debería analizarse de manera directa el grado de tolerancia celular frente a la toxicidad del EtOH que se ha utilizado como disolvente a la hora de obtener los extractos.

Centrándonos en los ensayos con PLA, a la hora de solventar la baja afinidad de las ECFCs por el polímero, su superficie podría ser funcionalizada mediante la inmovilización de distintas biomoléculas como que incluyan proteínas de adhesión como, colágeno o fibronectina, o incluso la gelatina empleada para la siembra y cultivo de las ECFCs. Del mismo modo que se estudia un rango de concentraciones de los distintos extractos puros, debería elaborarse una curva que recoja el efecto de matrices impregnadas a distintas concentraciones para poder determinar el mismo valor límite al que hacíamos mención previamente, evitando así la inhibición completa de la proliferación sobre el polímero.

Otro punto interesante sería comparar el efecto sobre el proceso de endotelización que presenten la matriz polimérica impregnada con extractos naturales y otra matriz idéntica impregnada con compuestos farmacológicos que hayan demostrado previamente actividad antiinflamatoria, antiproliferativa o antioxidante.

A pesar de que los resultados han sido satisfactorios, también podrían mejorarse diversos aspectos tanto de los procesos de extracción e impregnación como de la caracterización de los productos obtenidos. En lo que respecta a la obtención de los extractos, podrían utilizarse otras técnicas novedosas como pueden ser la SFE y la ESE. En caso de mantener la extracción con líquidos presurizados, sería de interés analizar el efecto del uso de mezclas hidroalcohólicas o incluso tras acidificar el medio acuoso entorno a pH 1.0 - 3.0, dado que en la bibliografía estas condiciones se asocian a rendimientos más altos del

proceso extractivo. También podría evaluarse la viabilidad del uso de una gama más amplia de residuos como pueden ser tallos o semillas para la obtención de compuestos bioactivos.

A la hora de conseguir una caracterización más precisa de los extractos podrían analizarse sus componentes mediante técnicas de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y evaluarse otras propiedades funcionales de interés farmacológico como su capacidad antiinflamatoria y antimicrobiana.

Pasando al capítulo de las impregnaciones, sería recomendable estudiar la influencia directa de las variables de operación; especialmente la presión, sobre los resultados finales. Podría establecerse un rango de presiones de trabajo que alcanzara valores de 400-500 bar, valores a los que se obtuvieron los mejores resultados en estudios previos centrados en la impregnación de distintas matrices poliméricas.

Otro aspecto a tener cuenta es la necesidad de realizar pruebas para evaluar las propiedades mecánicas tanto del polímero sin procesar como de los productos resultantes tras el proceso de impregnación. En caso de que dichas propiedades no fueran aptas, sería conveniente extender el estudio hacia otros polímeros como la policaprolactona (PCL) y el ácido poliglicólico (PGA) o bien modificar el PLA original generando copolímeros o matrices compuestas que se adapten mejor a los estándares requeridos.

Dado el carácter farmacoactivo que presenta el polímero una vez impregnado, también sería conveniente modelizar su comportamiento analizando la cinética de liberación de los compuestos naturales impregnados mediante ensayos *in vitro* que replicaran las condiciones fisiológicas.

10. BIBLIOGRAFÍA

- al-Aown, A., Kyriazis, I., Kallidonis, P., Kraniotis, P., Rigopoulos, C., Karnabatidis, D., ... Liatsikos, E. (2010). Ureteral stents: New ideas, new designs. *Therapeutic Advances in Urology*, 2(2), 85-92. <https://doi.org/10.1177/1756287210370699>
- Aljihmani, L., Alic, L., Boudjemline, Y., Hijazi, Z. M., Mansoor, B., Serpedin, E., & Qaraqe, K. (2019). Magnesium-Based Bioresorbable Stent Materials: Review of Reviews. *Journal of Bio- and Tribo-Corrosion*, 5(1), 1-15. <https://doi.org/10.1007/s40735-019-0216-x>
- Ang, H. Y., Ng, J., Bulluck, H., Wong, P., Venkatraman, S., Huang, Y., & Foin, N. (2018). Fundamentals of bioresorbable stents. *Functionalised Cardiovascular Stents*, 75-97. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100496-8.00005-6>
- Araújo, J. R., Gonçalves, P., & Martel, F. (2011). Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutrition Research*, 31(2), 77-87. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2011.01.006>
- Balea, Ș. S., Pârvu, A. E., Pârvu, M., Vlase, L., Dehelean, C. A., & Pop, T. I. (2020). Antioxidant, Anti-Inflammatory and Antiproliferative Effects of the Vitis vinifera L. var. Fetească Neagră and Pinot Noir Pomace Extracts. *Frontiers in Pharmacology*, 11(July), 1-11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00990>
- Balea, S. S., Pârvu, A. E., Pop, N., Marín, F. Z., & Pârvu, M. (2018). Polyphenolic compounds, antioxidant, and cardioprotective effects of pomace extracts from Fetească neagră cultivar. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8194721>
- Barea-Álvarez, M., Delgado-Andrade, C., Haro, A., Olalla, M., Seiquer, I., & Rufián-Henares, J. Á. (2016). Subtropical fruits grown in Spain and elsewhere: A comparison of mineral profiles. *Journal of Food Composition and Analysis*, 48, 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.02.001>
- Barraón-Catalán, E., Taamalli, A., Quirantes-Piné, R., Roldan-Segura, C., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., ... Zarrouk, M. (2015). Differential metabolomic analysis of the potential antiproliferative mechanism of olive leaf extract on the JIMT-1 breast cancer cell line. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 105, 156-162. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.11.048>
- BQ. (s. f.). PLA filamento: ficha técnica. Recuperado 12 de agosto de 2020, de <https://www.bq.com/es/support/pla-premium/support-sheet>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Brezoiu, A. M., Matei, C., Deaconu, M., Stanciuc, A. M., Trifan, A., Gaspar-Pintiliescu, A., & Berger, D. (2019). Polyphenols extract from grape pomace. Characterization and valorisation through encapsulation into mesoporous silica-type matrices. *Food and Chemical Toxicology*, 133(June), 110787. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110787>
- Cejudo Bastante, C., Casas Cardoso, L., Mantell Serrano, C., & Martínez de la Ossa, E. J. (2017). Supercritical impregnation of food packaging films to provide antioxidant properties.

- Journal of Supercritical Fluids*, 128(May), 200-207.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.05.034>
- Champeau, M., Thomassin, J. M., Tassaing, T., & Jérôme, C. (2015). Drug loading of polymer implants by supercritical CO₂ assisted impregnation: A review. *Journal of Controlled Release*, 209, 248-259. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.05.002>
 - Champeau, Mathilde, Thomassin, J. M., Tassaing, T., & Jerome, C. (2015). Drug Loading of Sutures by Supercritical CO₂ Impregnation: Effect of Polymer/Drug Interactions and Thermal Transitions. *Macromolecular Materials and Engineering*, 300(6), 596-610. <https://doi.org/10.1002/mame.201400369>
 - Chaudhry, S., Dehne, K., & Hussain, F. (2019). A review of suture anchors. *Orthopaedics and Trauma*, 33(4), 263-270. <https://doi.org/10.1016/j.morth.2016.12.001>
 - DeCicco-Skinner, K. L., Henry, G. H., Cataisson, C., Tabib, T., Curtis Gwilliam, J., Watson, N. J., ... AU - Colucci-D'Amato, L. (2019). HUVEC Tube-formation Assay to Evaluate the Impact of Natural Products on Angiogenesis. *JoVE*, 10(148), e58591. <https://doi.org/doi:10.3791/58591>
 - Delgado-Hernández, R., Hernández-Balmaseda, I., Rodeiro-Guerra, I., Cesar Rodriguez Gonzalez, J., De Wever, O., Logie, E., ... Vanden Berghe, W. (2020). Anti-angiogenic effects of mangiferin and mechanism of action in metastatic melanoma. *Melanoma research*, 30(1), 39-51. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000647>
 - Dong, H., Li, D., Mao, D., Bai, N., Chen, Y., & Li, Q. (2018). Enhanced performance of magnesium alloy for drug-eluting vascular scaffold application. *Applied Surface Science*, 435, 320-328. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.11.090>
 - Duarte, A. R. C., Simplicio, A. L., Vega-González, A., Subra-Paternault, P., Coimbra, P., Gil, M. H., ... Duarte, C. M. M. (2007). Supercritical fluid impregnation of a biocompatible polymer for ophthalmic drug delivery. *Journal of Supercritical Fluids*, 42(3 SPEC. ISS.), 373-377. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2007.01.007>
 - Elmore, J. B., Mehanna, E., Parikh, S. A., & Zidar, D. A. (2016). Restenosis of the Coronary Arteries: Past, Present, Future Directions. *Interventional Cardiology Clinics*, 5(3), 281-293. <https://doi.org/10.1016/j.iccl.2016.03.002>
 - Fernández-Ponce, M. T., López-Biedma, A., Sánchez-Quesada, C., Casas, L., Mantell, C., Gaforio, J. J., & Martínez De La Ossa, E. J. (2017). Selective antitumoural action of pressurized mango leaf extracts against minimally and highly invasive breast cancer. *Food and Function*, 8(10), 3610-3620. <https://doi.org/10.1039/c7fo00877e>
 - Fernández-Ponce, M. T., Medina-Ruiz, E., Casas, L., Mantell, C., & Martínez de la Ossa-Fernández, E. J. (2018). Development of cotton fabric impregnated with antioxidant mango polyphenols by means of supercritical fluids. *Journal of Supercritical Fluids*, 140(June), 310-319. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.06.022>
 - Fernández-Ponce, M^a Teresa, Casas, L., Mantell, C., & De La Ossa, E. M. (2015). Use of high pressure techniques to produce *Mangifera indica* L. leaf extracts enriched in potent antioxidant phenolic compounds. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 29, 94-106. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.04.006>
 - Fernández-Ponce, M^a Teresa, Parjikolaei, B. R., Lari, H. N., Casas, L., Mantell, C., & Martínez de la Ossa, E. J. (2016). Pilot-plant scale extraction of phenolic compounds from mango leaves

using different green techniques: Kinetic and scale up study. *Chemical Engineering Journal*, 299, 420-430. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.04.046>

- Fernández Álvarez, M. (2009). *Estudio del comportamiento fotoquímico y determinación de compuestos fitosanitarios en matrices medioambientales y agroalimentarias mediante técnicas avanzadas de extracción y microextracción*. Recuperado de <http://hdl.handle.net/10347/2586>
- Fundación Wikimedia Inc. (s. f.). Modelo del diagrama de fases típico de una sustancia de único componente en función de la temperatura y la presión. Recuperado 11 de agosto de 2020, de https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phase-diag_es.svg
- Georgiev, V., Ananga, A., & Tsoleva, V. (2014). Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. *Nutrients*, 6(1), 391-415. <https://doi.org/10.3390/nu6010391>
- Goldsmith, C. D., Bond, D. R., Jankowski, H., Weidenhofer, J., Stathopoulos, C. E., Roach, P. D., & Scarlett, C. J. (2018). The olive biophenols oleuropein and hydroxytyrosol selectively reduce proliferation, influence the cell cycle, and induce apoptosis in pancreatic cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 1-17. <https://doi.org/10.3390/ijms19071937>
- Goulas, V., Exarchou, V., Trovanis, A. N., Psomiadou, E., Fotsis, T., Briasoulis, E., & Gerothanassis, I. P. (2009). Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53(5), 600-608. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800204>
- Haloui, E., Marzouk, B., Marzouk, Z., Bouraoui, A., & Fenina, N. (2011). Hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves: Potent anti-inflammatory and analgesic activities. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 9(3-4), 128-133.
- Herrero, M., Temirzoda, T. N., Segura-Carretero, A., Quirantes, R., Plaza, M., & Ibañez, E. (2011). New possibilities for the valorization of olive oil by-products. *Journal of Chromatography A*, 1218(42), 7511-7520. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.053>
- Htay, T., & Liu, M. W. (2005). *Drug-eluting stent : a review and update*. 1(4), 263-276.
- Iqbal, J., Gunn, J., & Serruys, P. W. (2013). Coronary stents: Historical development, current status and future directions. *British Medical Bulletin*, 106(1), 193-211. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldt009>
- Jara-Palacios, M. J., Hernanz, D., Cifuentes-Gomez, T., Escudero-Gilete, M. L., Heredia, F. J., & Spencer, J. P. E. (2015). Assessment of white grape pomace from winemaking as source of bioactive compounds, and its antiproliferative activity. *Food Chemistry*, 183, 78-82. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.022>
- Kamath, K. R., Barry, J. J., & Miller, K. M. (2006). The TaxusTM drug-eluting stent: A new paradigm in controlled drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(3), 412-436. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.01.023>
- Khumpook, T., Saenphet, S., Tragoolpua, Y., & Saenphet, K. (2019). Anti-inflammatory and antioxidant activity of Thai mango (*Mangifera indica* Linn.) leaf extracts. *Comparative Clinical Pathology*, 28(1), 157-164. <https://doi.org/10.1007/s00580-018-2809-z>
- Lee, J., Durst, R. W., & Wrolstad, R. E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88(5), 1269-1278. <https://doi.org/10.1093/jaoac/88.5.1269>

- Lee, O. H., & Lee, B. Y. (2010). Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource Technology*, 101(10), 3751-3754. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.052>
- Li, B. B., Smith, B., & Hossain, M. M. (2006). Extraction of phenolics from citrus peels: I. Solvent extraction method. *Separation and Purification Technology*, 48(2), 182-188. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2005.07.005>
- Li, K., & Xu, Z. (2019). A review of current progress of supercritical fluid technologies for e-waste treatment. *Journal of Cleaner Production*, 227, 794-809. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.04.104>
- Manavitehrani, I., Fathi, A., Badr, H., Daly, S., Negahi Shirazi, A., & Dehghani, F. (2016). Biomedical Applications of Biodegradable Polyesters. *Polymers*, 8. <https://doi.org/10.3390/polym8010020>
- McCormick, C. (2018). Overview of cardiovascular stent designs. En *Functionalised Cardiovascular Stents*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100496-8.00001-9>
- Milovanovic, S., Markovic, D., Mrakovic, A., Kuska, R., Zizovic, I., Frerich, S., & Ivanovic, J. (2019). Supercritical CO₂ - assisted production of PLA and PLGA foams for controlled thymol release. *Materials Science and Engineering C*, 99(October 2017), 394-404. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.106>
- Mitra, A. K., & Agrawal, D. K. (2006). In stent restenosis: Bane of the stent era. *Journal of Clinical Pathology*, 59(3), 232-239. <https://doi.org/10.1136/jcp.2005.025742>
- Mustafa, A., & Turner, C. (2011). Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta*, 703(1), 8-18. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.018>
- Nekooeian, A., Khalili, A., & Khosravi, M. (2014). Oleuropein offers cardioprotection in rats with simultaneous type 2 diabetes and renal hypertension. *Indian Journal of Pharmacology*, 46(4), 398-403. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.135951>
- Núñez Selles, A. J., Daglia, M., & Rastrelli, L. (2016). The potential role of mangiferin in cancer treatment through its immunomodulatory, anti-angiogenic, apoptotic, and gene regulatory effects. *BioFactors*, 42(5), 475-491. <https://doi.org/10.1002/biof.1299>
- O., M. S., & R., M. A. (2001). Bench to Bedside. *Circulation*, 104(8), 852-855. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.104.8.852>
- OIV, & International Organisation of Vine and Wine. (2019). 2019 Statistical Report on World Vitiviniculture. En *2019 Statistical Report on World Vitiviniculture*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1678>
- Oreopoulou, A., Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2019). Extraction of Polyphenols From Aromatic and Medicinal Plants: An Overview of the Methods and the Effect of Extraction Parameters. En *Polyphenols in Plants* (2.^a ed.). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813768-0.00025-6>
- Otero-Pareja, M. J., Casas, L., Fernández-Ponce, M. T., Mantell, C., & De La Ossa, E. J. M. (2015). Green extraction of antioxidants from different varieties of red grape pomace. *Molecules*, 20(6), 9686-9702. <https://doi.org/10.3390/molecules20069686>
- Pereira, D. T. V., Tarone, A. G., Cazarin, C. B. B., Barbero, G. F., & Martínez, J. (2019).

- Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from grape marc. *Journal of Food Engineering*, 240(February 2018), 105-113. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.07.019>
- Putnik, P., Barba, F. J., Španić, I., Zorić, Z., Dragović-Uzelac, V., & Bursać Kovačević, D. (2017). Green extraction approach for the recovery of polyphenols from Croatian olive leaves (*Olea europea*). En *Food and Bioproducts Processing* (Vol. 106, pp. 19-28). <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.08.004>
 - Ringuet, J., & Viña, S. (2013). Productos naturales vegetales. En *Universidad Nacional de La Plata* (Vol. 1). Recuperado de http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/27885/Documento_completo_.pdf?sequence=1
 - Sampogna, G., Guraya, S. Y., & Forgione, A. (2015). Regenerative medicine: Historical roots and potential strategies in modern medicine. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 3(3), 101-107. <https://doi.org/10.1016/j.jmau.2015.05.002>
 - Sanchez-Sanchez, J., Fernández-Ponce, M. T., Casas, L., Mantell, C., & de la Ossa, E. J. M. (2017). Impregnation of mango leaf extract into a polyester textile using supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 128(May), 208-217. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.05.033>
 - Savaris, M., Garcia, C. S. C., Roesch-Ely, M., Henriques, J. A. P., dos Santos, V., & Brandalise, R. N. (2019). Polyurethane/poly(D,L-lactic acid) scaffolds based on supercritical fluid technology for biomedical applications: Studies with L929 cells. *Materials Science and Engineering C*, 96(February 2018), 539-551. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.11.054>
 - Sayadi, S., & Calatrava, J. (2009). STRUCTURE AND PRODUCTIVITY OF SPANISH MANGO INDUSTRY: A FARMERS SURVEY ANALYSIS. *Acta Horticulturae*, (820), 47-56. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.820.2>
 - Scherer, R., & Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112(3), 654-658. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.026>
 - Serra-Peñaranda, A., Miranda-Guardiola, F., & Venegas-Aravena, R. (2007). Análisis y características de los stents farmacoactivos disponibles en la actualidad. Futuros desarrollos. *Revista Espanola de Cardiologia Suplementos*, 7(E), 8E-28E. [https://doi.org/10.1016/s1131-3587\(07\)75778-3](https://doi.org/10.1016/s1131-3587(07)75778-3)
 - Sotomi, Y., Onuma, Y., Collet, C., Tenekecioglu, E., Virmani, R., Kleiman, N. S., & Serruys, P. W. (2017). Bioresorbable scaffold: The emerging reality and future directions. *Circulation Research*, 120(8), 1341-1352. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310275>
 - Stefanini, G. G., Byrne, R. A., Serruys, P. W., De Waha, A., Meier, B., Massberg, S., ... Kastrati, A. (2012). Biodegradable polymer drug-eluting stents reduce the risk of stent thrombosis at 4 years in patients undergoing percutaneous coronary intervention: A pooled analysis of individual patient data from the ISAR-TEST 3, ISAR-TEST 4, and LEADERS randomized trial. *European Heart Journal*, 33(10), 1214-1222. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs086>
 - Stoica, R., Senin, R. M., & Ion, R. M. (2013). Ethanol concentration effect on the extraction of phenolic compounds from *ribes nigrum* assessed by spectrophotometric and HPLC-DAD methods. *Revista de Chimie*, 64(6), 620-624.

- Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E. M., Garrido, J., & Borges, F. (2013). Hydroxycinnamic acid antioxidants: An electrochemical overview. *BioMed Research International*, 2013(February 2014). <https://doi.org/10.1155/2013/251754>
- Tomberli, B., Mattesini, A., Baldereschi, G. I., & Di Mario, C. (2018). A Brief History of Coronary Artery Stents. *Revista Espanola de Cardiologia*, 71(5), 312-319. <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2017.11.016>
- Türker, N., & Erdog̃du, F. (2006). Effects of pH and temperature of extraction medium on effective diffusion coefficient of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* var. L.). *Journal of Food Engineering*, 76(4), 579-583. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.06.005>
- Üzer, S., Akman, U., & Hortaçsu, Ö. (2006). Polymer swelling and impregnation using supercritical CO₂: A model-component study towards producing controlled-release drugs. *Journal of Supercritical Fluids*, 38(1), 119-128. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2005.11.005>
- Verano Naranjo, L. (2020). *Impregnación supercrítica de sustancias activas en polímeros utilizados en impresión 3D para su aplicación biomédica*.
- Vogel, P., Machado, I. K., Garavaglia, J., Zani, V. T., de Souza, D., & Dal Bosco, S. M. (2015). Beneficios polifenoles hoja de olivo (*Olea europaea* L) para la salud humana. *Nutricion Hospitalaria*, 31(3), 1427-1433. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.3.8400>
- Xynos, N., Papaefstathiou, G., Psychis, M., Argyropoulou, A., Aligiannis, N., & Skaltsounis, A. L. (2012). Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. *Journal of Supercritical Fluids*, 67, 89-93. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.03.014>
- Yang, Y., & Zhang, F. (2008). Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(4), 308-313. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2007.05.001>
- Zhang, X., Qu, W., Li, D., Shi, K., Li, R., Han, Y., ... Chen, X. (2020). Functional Polymer-Based Nerve Guide Conduits to Promote Peripheral Nerve Regeneration. *Advanced Materials Interfaces*, 7(14), 1-21. <https://doi.org/10.1002/admi.202000225>
- Zhang, Y., Liu, X., Zeng, L., Zhang, J., Zuo, J., Zou, J., ... Chen, X. (2019). Polymer Fiber Scaffolds for Bone and Cartilage Tissue Engineering. *Advanced Functional Materials*, 29(36), 1-20. <https://doi.org/10.1002/adfm.201903279>
- Zhao, W., Li, J., Jin, K., Liu, W., Qiu, X., & Li, C. (2016). Fabrication of functional PLGA-based electrospun scaffolds and their applications in biomedical engineering. *Materials Science and Engineering C*, 59, 1181-1194. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.11.026>